

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



ESTUDIO Y CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN  
BIOQUÍMICO Y CELULAR DE COMPUESTOS ANTITUMORALES  
DIRIGIDOS CONTRA EL CITOESQUELETO

TESIS DOCTORAL DE:

**CHIARA TRIGILI**

BAJO LA DIRECCIÓN DE:

**FERNANDO DÍAZ PEREIRA  
ISABEL BARASOAIN BLASCO**

Madrid, 2013

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



***Estudio y caracterización del mecanismo de  
acción bioquímico y celular de compuestos  
antitumorales dirigidos contra el  
citoesqueleto***

**TESIS DOCTORAL**

***Chiara Trigili***

Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo superior de Investigaciones Científicas  
(CSIC)  
**Madrid, 2013**







**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



***Estudio y caracterización del mecanismo de  
acción bioquímico y celular de compuestos  
antitumorales dirigidos contra el  
citoesqueleto***

Memoria para optar al grado de  
Doctor en Biología

***Chiara Trigili***

Directores:

J. Fernando Díaz Pereira e Isabel Barasoain Blasco

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)

**Madrid, 2013**



## **Índice**



<b>Abreviaturas y Términos anglosajones</b>	21
<b>Summary</b>	27
<b>Introducción</b>	37
1. Patología y farmacología del cáncer.	39
1.1. Las distintas modalidades de tratamiento del cáncer.	41
1.1.1. Quimioterapia antitumoral.	44
1.2. Inmunoterapia.	48
2. Citoesqueleto y sus componentes.	50
2.1. Filamentos intermedios.	50
2.2. Actina y microfilamentos.	52
2.3. Tubulina y microtubulos.	55
2.3.1. Dinámica de los microtúbulos.	58
3. Compuestos con potencial uso farmacéutico dirigidos contra microtúbulos y microfilamentos.	64
3.1. Agentes antimitóticos dirigidos contra tubulina.	65
3.1.1. Promotores del ensamblaje de microtúbulos: medicamentos estabilizantes.	67
3.1.1.1. Ligandos del sitio del paclitaxel.	67
3.1.1.1.1. Discodermolida y dictiostatina.	69
3.1.1.2. Laulimalida y pelorusido A.	72
3.1.2. Inhibidores del ensamblaje de microtúbulos: medicamentos desestabilizantes.	73
3.1.2.1. Sitio de unión en $\beta$ -tubulina.	73
3.1.2.1.1. Ligandos del dominio de vinca.	73
3.1.2.1.2. Ligandos del dominio de colchicina.	75
3.1.2.1.2.1. Podofilotoxina.	76
3.1.2.2. Sitio de unión en $\alpha$ -tubulina.	77
3.1.2.2.1. Pironetina.	78
3.2. Agentes antimitóticos dirigidos contra actina.	79

3.2.1. Amfidinolidas.	79
3.3. Resistencia a agentes quimioterapéuticos dirigidos contra el citoesqueleto.	80
<b>Objetivos</b>	85
<b>Materiales y métodos</b>	89
1. Productos químicos, tampones, ligandos, líneas celulares y condiciones de cultivo.	91
1.1. Productos químicos.	91
1.2. Tampones.	92
1.3. Ligandos.	92
1.4. Líneas celulares y condiciones de cultivo.	93
2. Caracterización de los ligandos.	94
2.1. Método de análisis.	94
2.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	95
2.1.1.1. Descontaminación de la muestra 2.	96
2.1.2. Espectrofotometría en el ultravioleta-visible.	97
2.1.3. Espectrometría de masas.	97
3.1. Proteínas.	97
3.1. Purificación de tubulina.	97
3.2. Preparación de microtúbulos estabilizados.	98
3.2.1. Medida de la concentración de sitios de unión de paclitaxel en microtúbulos estabilizados.	99
4. Efecto de los ligandos en células.	100
4.1. Ensayo de citotoxicidad.	100
4.1.1. Ensayo de sinergia.	101
4.1.1.1. Análisis estadístico.	102
4.2. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.	102
4.3. Análisis del ciclo celular.	103
5. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de	

tubulina.	104
5.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.	104
5.1.1. Ensamblaje en fosfato.	104
5.1.2. Ensamblaje en fosfato y glicerol.	104
6. Determinación de la unión y de las constantes de afinidad de los compuestos en microtubulos y tubulina.	105
6.1. Determinación de la unión de los compuestos a tubulina.	105
6.1.1. Unión a microtúbulos estabilizados y nativos.	105
6.1.2. Unión a tubulina dimerica.	107
6.2. Determinación del sitio y de las constantes de unión de los compuestos en microtúbulos y tubulina no ensamblada.	108
6.2.1. Unión de los compuestos al sitio de paclitaxel.	108
6.2.1.1. Medida de anisotropía de fluorescencia y determinación de las constantes de afinidad de los ligandos en microtubulos estabilizados: ensayo de desplazamiento de flutax-2.	108
6.2.1.2. Ensayo de desplazamiento de epotilona B.	110
6.2.2. Unión de los compuestos al sitio de colchicina: ensayo de desplazamiento de MTC.	112
6.2.3. Unión de los ligandos al sitio en $\alpha$ -tubulina: ensayo de competición con pironetina.	113
7. Estructura de los microtúbulos inducidos por ligandos.	114
7.1. Determinación del diámetro de los microtúbulos (SAXS: <i>Small Angle X-ray Scattering</i> ).	114
8. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a tubulina y microtúbulos.	116
8.1. Ultracentrifugación analítica.	116

8.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).	116
8.3. Modelado molecular.	117
8.3.1. Estudio de los compuestos estabilizantes de microtúbulos.	117
8.3.2. Estudio de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos.	117
8.4. Cristalografía.	118
9. Interacción de los compuestos con actina y microfilamentos.	118
9.1. Estudios de polimerización y despolimerización de actina.	118
9.2. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a la actina.	119
<b>Resultados</b>	118
<u>Caracterización de la interacción de compuestos estabilizantes con tubulina y microtúbulos.</u>	124
1. Familia de dictiostatina y discodermolida.	124
1.1. Caracterización físico-química de los compuestos.	124
1.1.1. Caracterización química.	124
1.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y caracterización espectrofotométrica en el ultravioleta-visible.	128
1.2. Efectos de los ligandos en células.	133
1.2.1. Citotoxicidad.	133
1.2.1.1. Sinergia y análisis estadístico.	140
1.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.	145
1.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.	147

1.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.	152
1.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.	152
1.4. Determinación de la unión de los agentes estabilizantes de microtúbulos a tubulina no polimerizada.	154
1.4.1. Unión de discodermolida al heterodímero de $\alpha,\beta$ tubulina.	154
1.5. Determinación del sitio de unión de los ligandos en microtúbulos.	157
1.5.1. Medida de las constantes de unión de los ligandos a microtúbulos estabilizados: desplazamiento de flutax-2 y epotilona B.	157
1.5.1.1. Energía libre de Gibbs.	161
1.5.1.2. Entalpía y entropía.	161
1.6. Estructura de microtúbulos inducidos por ligandos.	164
1.6.1. Determinación del diámetro de los microtúbulos (SAXS: <i>Small Angle X-ray Scattering</i> ).	164
1.7. Estudio de la conformación de los compuestos unidos al heterodímero de $\alpha,\beta$ tubulina y microtúbulos.	166
1.7.1. Resonancia magnética nuclear (RMN) y modelado molecular.	166
1.8. Cristalografía de discodermolida a su sitio de unión en la tubulina.	173
2. Familia de pelorusido A.	175
2.1. Caracterización químico-física de los compuestos.	175
2.1.1. Caracterización química.	175
2.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución	

(HPLC) y caracterización espectrofotométrica en el ultravioleta-visible.	177
2.2. Efectos de los ligandos en células.	178
2.2.1. Citotoxicidad.	178
2.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.	179
2.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.	180
2.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.	182
2.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.	182
2.3.1.1. Ensamblaje en ausencia y presencia de glicerol.	182
2.4. Determinación de la unión de los compuestos a microtúbulos.	183
2.4.1. Estequiometría de unión de los compuestos a microtúbulos estabilizados y nativos.	183
2.4.2. Medida de las constantes de unión de los ligandos a microtúbulos estabilizados: desplazamiento de flutax-2.	185
2.5. Hidrólisis del análogo 19 en el medio de cultivo celular.	187
2.6. Estructura de microtúbulos inducidos por ligandos.	189
2.6.1. Determinación del diámetro de los microtúbulos: SAXS.	189
2.7. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a tubulina y microtúbulos.	190
2.7.1. RMN y modelado molecular.	190
2.7.2. Epítomos de unión del pelorusido A unido a microtúbulos estabilizados.	192

<u>Caracterización de la interacción de compuestos desestabilizantes con tubulina y microtúbulos.</u>	194
3. Familia de pironetina.	194
3.1. Caracterización químico-física de los compuestos	194
3.1.1. Caracterización química.	194
3.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y caracterización espectrofotométrica en el ultravioleta-visible.	197
3.2. Efectos de los ligandos en células.	198
3.2.1. Citotoxicidad.	198
3.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.	199
3.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.	202
3.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.	205
3.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.	205
3.4. Determinación de la unión de los compuestos a microtúbulos.	206
3.4.1. Unión de los análogos de pironetina al sitio en $\alpha$ -tubulina.	206
4. Familia de podofilotoxina.	209
4.1. Caracterización químico-física de los compuestos.	209
4.1.1. Caracterización química.	209
4.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	211
4.2. Efectos de los ligandos en células.	211
4.2.1. Citotoxicidad.	211

4.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.	212
4.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.	215
4.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.	217
4.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.	217
4.4. Determinación del sitio de unión de los ligandos en microtúbulos.	219
4.4.1. Unión de los compuestos al sitio de colchicina.	219
4.5. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a tubulina.	221
4.5.1. Modelado molecular.	221

<u>Caracterización de compuestos que interactúan con actina y microfilamentos.</u>	222
--	-----

5. Familia de amfidinolidas.	222
5.1. Caracterización físico-química de los compuestos.	222
5.1.1. Caracterización química.	222
5.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).	223
5.2. Efectos de los ligandos en células.	223
5.2.1. <i>Citotoxicidad</i> .	223
5.2.2. Efecto sobre los componentes del citoesqueleto (microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios) y la morfología celular.	224
5.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.	227
5.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura	



por ligando.	227
5.4. Determinación del sitio de unión de los ligandos en microtúbulos.	228
5.4.1. Unión al sitio de paclitaxel y de colchicina.	228
5.4.2. Unión a microtúbulos estabilizados y nativos.	230
5.5. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de actina.	230
5.5.1. Modulación del ensamblaje de actina por ligando.	230
5.6. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a la actina.	231
5.6.1. Modelado molecular.	231

## **Discusión** 235

1. Familia de dictiostatina y discodermolida.	236
1.1. Los compuestos estudiados exhiben la capacidad de estabilizar los microtúbulos del huso mitótico, y vencen el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos (MDR) por todos los mecanismos conocidos: MDR, $\beta$ -III y mutaciones.	236
1.2. La mayoría de los compuestos seleccionados de la familia de dictiostatina y discodermolida interaccionan sinérgicamente con otros agentes estabilizantes de microtubulos (MSA), tales como paclitaxel y pelorusido A.	243
1.3. Los agentes en estudio alteran el estado de agregación de la tubulina, promoviendo la formación de los microtúbulos <i>in vitro</i> , e inhiben fuertemente la unión del paclitaxel a su sitio.	
Al igual que el paclitaxel, los ligandos que se unen al mismo sitio muestran una marcada dependencia de la afinidad con la temperatura.	246

1.4. Los valores de citotoxicidad obtenidos en presencia de los ligandos objeto de estudio se correlacionan bien con las respectivas afinidades de dichos compuestos con los microtúbulos.	249
1.5. Influencia de las modificaciones en la actividad de los compuestos.	251
1.5.1. Entre las distintas modificaciones estructurales realizadas, la eliminación del metilo en posición C6, la hidrogenación del doble enlace en posición C2-C3, la sustitución de un -OH por un -OMe en posición C9 y la adición de un doble enlace en posición C4-C5 mejoran la actividad de los productos de síntesis <b>4</b> , <b>6</b> , <b>9</b> y <b>12</b> , respectivamente, en comparación con las moléculas base.	251
1.6. La discodermolida se une y cosedimenta con la tubulina dimérica.	255
1.7. Los productos investigados, a excepción de la molécula parental <b>3</b> y del híbrido discodermolida/dictiostatina <b>15</b> , no modifican la estructura de los microtúbulos.	256
1.8. La combinación entre los datos experimentales de TR-NOE y de RMN STD y los cálculos de CORCEMA-ST indican que la discodermolida se une a un sitio adicional en el poro tipo I de los microtúbulos. Dicho sitio es diferente del sitio de unión luminal.	257
2. Familia de pelorusido A.	261
2.1. La modificación del alcohol primario localizado en la posición C24 no influye en la actividad celular de los compuestos ensayados.	261
2.2. La sustitución del alcohol primario en la	

posición C24 impide la unión a microtúbulos (estabilizados y nativos) y la inducción del ensamblaje de tubulina pura.	263
2.3. El sitio de unión en los microtúbulos se localiza en la subunidad $\beta$ de la tubulina.	264
3. Familia de pironetina.	270
3.1. Los análogos simplificados de la pironetina conservan una proporción medible de la actividad citotóxica del producto natural y, como éste, se clasifican como agentes desestabilizantes de microtúbulos.	270
3.2. Los productos de síntesis de la familia de la pironetina alteran el estado de agregación de la tubulina impidiendo la formación de los microtúbulos.	272
3.3. La eliminación del grupo hidroxilo en la posición C7 no influye en la actividad de los análogos estereoisoméricos.	273
4. Familia de podofilotoxina.	275
4.1. Los epímeros $7\beta$ -OH son significativamente más potentes que sus correspondientes análogos $7\alpha$ -OH. La ausencia del grupo hidroxilo en la posición C7 no influye en la actividad del compuesto en las células ensayadas.	275
4.2. Las modificaciones realizadas en los compuestos objeto de estudio conservan o incluso mejoran las propiedades desestabilizantes de la podofilotoxina.	278
4.3. El dímero de tubulina es la diana molecular de los compuestos estudiados, que se une al sitio de colchicina, con exclusión de los ligandos <b>39<math>\alpha</math></b> y <b>40<math>\alpha</math></b> .	278
5. Familia de amfidinolidas.	283

5.1. La red de microfilamentos es la diana celular de los compuestos investigados.	283
5.2. Los compuestos estudiados no interaccionan con los microtúbulos (estabilizados o nativos) y no se unen ni al sitio del paclitaxel ni al sitio de la colchicina.	285
5.3. El mecanismo de acción de los compuestos estudiados consiste en la alteración del estado de agregación de la actina impidiendo la formación de los microfilamentos.	285
5.4. El sitio de unión de los compuestos estudiados se localiza en la cavidad relativamente hidrofóbica de G-actina, donde se une la citocalasina D.	287
<b>Conclusiones</b>	289
1.Familia de dictiostatina y discodermolida	291
2.Familia de pelorusido A	292
3.Familia de pironetina	292
4.Familia de podofilotoxina	293
5.Familia de amfidinolidas	293
<b>Bibliografía</b>	295
<b>Publicaciones</b>	339



**Abreviaturas y Términos**  
**anglosajones**



<b>ABC</b>	Proteína transportadora con motivo de unión al ATP (del inglés: <i>ATP Binding Cassette</i> ).
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato.
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina (del inglés: <i>Bovine Seroalbumin</i> ).
<b>CCD</b>	Dispositivo de cargas interconectadas.
<b>CI50</b>	Concentración inhibitoria 50.
<b>Cr</b>	Concentración crítica.
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Agua deuterada.
<b>DEAE</b>	Dietilaminoetil celulosa.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>DMSO-D<sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido deuterado.
<b>EDTA</b>	Ácido etilen-diamino-tetra-acético.
<b>EGTA</b>	Tetra-acetato de etilenglicol.
<b>FDA</b>	Agencia de alimentos y medicamentos (del inglés: <i>Food and Drug Administration</i> ).
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína.
<b>Flutax-2</b>	7-0-[N-(2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil]paclitaxel.
<b>GAB</b>	Tampón de ensamblaje con glicerol (del inglés: <i>Glycerol Assembly Buffer</i> ).
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato.
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato.
<b>gp-P</b>	Glicoproteína-P.
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés: <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ).
<b>IC</b>	Índice de combinación.
<b>Isotipo <math>\beta</math>III de tubulina</b>	Isotipo de $\beta$ -tubulina de clase III.
<b>K<sub>(l)</sub></b>	Constante de unión del ligando.



<b>HPLC-MS</b>	Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas.
<b>Loop</b>	Lazo.
<b>mAbs</b>	Anticuerpos monoclonales (del inglés: <i>monoclonal Antibodies</i> ).
<b>MDR</b>	Resistencia múltiple a fármacos (del inglés: <i>Multiple Drug Resistance</i> ).
<b>Mrp1</b>	Proteína asociada a resistencia múltiple 1 (del inglés: <i>Multiple resistance protein-1</i> ).
<b>MSA</b>	Agentes estabilizantes de microtúbulos (del inglés: <i>Microtubule Stabilizing Agents</i> ).
<b>MTC</b>	2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona.
<b>MTOCs</b>	Centros organizadores de microtúbulos (del inglés: <i>Microtubule Organizing Centers</i> ).
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio.
<b>NRMSD</b>	Desviación cuadrática media normalizada (del inglés: <i>Normalized Root-Mean-Square</i> ).
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear (del inglés: <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> ).
<b>RNasa</b>	Actividad hidrolítica de RNA.
<b>NOE</b>	Efecto Overhauser nuclear (del inglés: <i>Nuclear Overhauser Effect</i> ).
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino (del inglés: <i>Phosphate Buffered Saline</i> ).
<b>PDB</b>	Banco de datos de proteínas (del inglés: <i>Protein Data Bank</i> ).
<b>Pipes</b>	Ácido piperazin-N,N'-bis (ácido 2-etanosulfónico).
<b>RMSD</b>	Desviación cuadrática media (del inglés: <i>Root-Mean-Square</i> ).
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>R/S</b>	Índice de resistencia.

<b>SAXS</b>	Difracción de rayos X a bajo ángulo (del inglés: <i>Small Angle X-ray Scattering</i> ).
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico (del inglés: <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> ).
<b>STD</b>	Diferencia en la transferencia de saturación (del inglés: <i>Saturation transfer difference</i> ).
<b>Treadmilling</b>	Fenómeno observado en microtúbulos y filamentos de actina consistente en un movimiento aparente causado por la adición de subunidades en un extremo y su disociación en el extremo opuesto.
<b>TR-NOESY</b>	Efecto Overhauser nuclear transferido (del inglés: <i>Transferred Nuclear Overhauser Effect</i> ).
<b>Tubulina-GDP</b>	Heterodímero de tubulina con GDP en sus sitio intercambiable.
<b>Tubulina-GTP</b>	Heterodímero de tubulina con GTP en su sitio intercambiable.
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b><math>\Delta G</math></b>	Variación de energía libre de Gibbs.
<b><math>\Delta H</math></b>	Variación de entalpía.
<b><math>\Delta S</math></b>	Variación de entropía.



## **Summary**



## **Introduction**

*Microtubules and actin filaments play important biological functions in connection with mitosis, cytokinesis, cell signaling, intracellular transport, and cell motility of eukaryotic cells (1, 2). Any external element that disrupts the correct functioning of tubulin and actin causes harmful effects to the body. Thus, it is reasonable that a majority of pharmacological research has focused on reactive products against proteins, many of which are natural compounds or analogues. There are several clinical drugs based on the stabilization (paclitaxel-like behavior) or destabilization (either vinca-like or colchicine-like behavior) of microtubules with regard to their heterodimeric component,  $\alpha,\beta$ -tubulin (3). On the other hand, none actin-targeting drug has entered yet in clinical studies.*

## **Research content and conclusions**

*This work takes a comprehensive approach to structure/function/ mechanistic interaction of different molecules which targets the cytoskeleton. Different compounds received were classified into three groups of different families according to their mechanism of action: microtubule stabilizing agents (dictyostatin and discodermolide family; peloruside A family), microtubule destabilizing compounds (pironetin family; podophyllotoxin family) and ligands acting at the level of actin filaments (amphidinolides family).*

*Given the interest, we have investigated the influence of chemical modifications in the binding affinity of the compounds for tubulin and actin. We employed biochemical and biophysical techniques to determine binding constants and stoichiometries as well as NMR techniques to determine the binding epitopes and bioactive conformations of the compounds. Also we used cell biology techniques to evaluate their effects on a panel of cells both sensitive to chemotherapy and resistant to it through three different mechanisms: overexpression of P-glycoprotein, overexpression of  $\beta$ III-tubulin isotypes and mutations in the  $\beta$ -tubulin gene.*

#### Dictyostatin and discodermolide family.

Since gaining FDA approval in 1992, paclitaxel and subsequently its semisynthetic analogue taxotere (docetaxel) have been widely used in clinical studies in regards to oncology treatments, including breast, ovarian, and lung cancers (4-7). Although the cytotoxic drugs of taxanes have great utility as chemotherapeutic agents, they suffer from low aqueous solubility and tend to induce drug resistance in patients (8), further underlining the continued need for the identification of new microtubule stabilizing agents. This need has led to the search for structurally novel natural product scaffolds that share the same mode of action as the taxanes but are more effective to overcome drug resistance. The naturally occurring compounds discodermolide (9) and dictyostatin (10) bind to microtubules, cause cell cycle arrest in G<sub>2</sub>M at nanomolar concentrations, and retain antiproliferative activity in paclitaxel-resistant cell lines (11, 12), making these compounds attractive candidates for development as antineoplastic agents. In this study, we examined a series of dictyostatin analogs and discodermolide/dictyostatin hybrids to probe biological and biochemical structure-activity relationships. A set of ten derivatives of dictyostatin and five hybrids of discodermolide and dictyostatin have been evaluated to determine the structural features required to improve the interaction of these compounds with microtubules.

The activity of the agents was evaluated against drug-sensitive and drug-resistant cancer cell lines. The compounds studied are cytotoxic and less susceptible than paclitaxel to multidrug resistance arising from overexpression of the P-glycoprotein efflux pump, exhibit remarkable potency against cell lines which have the isotype of  $\beta$ III-tubulin and are not affected by mutations that affect the taxoid binding site of  $\beta$ -tubulin. In cell proliferation assay, statistically significant synergy was found between some compounds investigated and paclitaxel, and between some of these compounds and the peloruside A. These results confirm that the discodermolide/dictyostatin family's compounds, when added in combination with other microtubule stabilizing agents, act synergistically to enhance the antimitotic action of the drugs, but also highlight the complexity of drug interactions in intact cells. In vitro studies with purified

tubulin indicate that these agents bind to the paclitaxel site (the binding is exothermic) and directly induce tubulin polymerization. Removal of the methyl group of dictyostatin at position 6, hydrogenation of the (Z)-alkene between positions 2 and 3, substitution of the hydroxyl at position 9 with a methoxy group and addition of a double bond between positions 4 and 5 resulted in significant enhancements of dictyostatin and discodermolide's binding affinity for the site and cytotoxicity.

The binding interaction of discodermolide to unassembled  $\alpha/\beta$ -tubulin heterodimers and microtubules has been studied using biochemical and NMR techniques. The use of discodermolide as a water-soluble paclitaxel biomimetic and extensive NMR experiments allowed the detection of binding of microtubule stabilizing agents to unassembled tubulin  $\alpha/\beta$ -heterodimers. The bioactive 3D structure of discodermolide bound to  $\alpha/\beta$ -heterodimers was elucidated and compared to those bound to microtubules. Moreover, the combination of experimental TR-NOE and STD NMR data with CORCEMA-ST calculations indicate that discodermolide targets an additional binding site at the pore of the microtubules, which is different from the internal binding site at the lumen previously determined by electron crystallography. Binding to this pore site can then be considered as the first ligand-protein recognition event that takes place in advance of the drug internalization process and interaction with the lumen of the microtubules (13).

#### Peloruside A family.

Peloruside A (14) is a microtubule-stabilizing agent that targets the same site as laulimalide. It binds to microtubules with a 1:1 stoichiometry and with a binding affinity in the low-nM range (15, 16). It reduces the number of microtubular protofilaments in the same way as paclitaxel. Although the binding affinity of the compound is comparable to that of the low-affinity stabilizing agent sarcodictyin (17), peloruside is more active in inducing microtubule assembly and is more cytotoxic to tumor cells; this suggests that the peloruside site is a more effective site for stabilizing microtubules. Acetylation of the C24 hydroxyl group results in inactive compounds. Using data-directed molecular docking simulations, we confirm that peloruside A binds within a pocket on the exterior of  $\beta$ -tubulin at a



previously unknown ligand site (18), rather than on  $\alpha$ -tubulin as suggested in earlier studies (19).

#### Pironetin family.

The action mechanism of a series of pironetin analogues with simplified structure is described in this work. Their cytotoxic activity and their interactions with tubulin have been investigated. It has been found that, while less active than the parent molecule (20-22), the pironetin analogues still share the mechanism of action of the latter and compete for the same binding site to  $\alpha$ -tubulin. Variations in the configurations of their stereocenters do not translate into relevant differences between biological activities (23).

#### Podophyllotoxins family.

Several pinacol derivatives of podophyllotoxins bearing different side chains and functions at C7 were synthesized through reductive cross-coupling of podophyllotoxone and several aldehydes and ketones. While possessing a hydroxylated chain at C7, the compounds retained their respective hydroxyl group with either the  $7\alpha$  (podo) or  $7\beta$  (epipodo) configuration. Cytotoxicities against neoplastic cells followed by cell cycle arrest and cellular microtubule disruption were evaluated and mechanistically characterized through tubulin polymerization inhibition and assays of binding to the colchicine site. Compounds of the epipodopinacol ( $7\beta$ -OH) series behaved similarly to podophyllotoxin in all the assays and proved to be the most potent inhibitors. Significantly,  $7\alpha$ -isopropyl-7-deoxypodophyllotoxin (**41**), without any hydroxyl function, appeared as a promising lead compound for a novel type of tubulin polymerization inhibitors. Experimental results were in overall agreement with modeling and docking studies performed on representative compounds of each series (24).

#### Amphidinolides family.

Biological studies of four small amphidinolides of the amphidinolide family have been reported. Their effect on the proliferation of A2780 (human ovarian carcinoma) and of LoVo (human colon carcinoma) cell lines, as well as on the

*cytoskeleton proteins tubulin, actin, and intermediate filaments of A549 lung carcinoma cells and PtK2 cells have been investigated. Their effect on actin polymerization was then studied in vitro. The findings indicate that the actin filament cytoskeleton rather than the microtubule cytoskeleton is the biological target of the compounds. We believe that this may also be the case for other small macrolides of the amphidinolide family. The influence of the ligand on the actin assembly in vitro is consistent with the actin disassembly effect observed in treated cells. As the ligands interacted with the disassembled actin (G-actin) in vitro, but they did not show any effect on the polymerized actin (F-actin), we suggest that their mechanism of action involves the inhibition of actin monomer additions to pre-existing filaments. Such an inhibition is similar to, albeit weaker than, that induced by cytochalasin B. Docking calculations of compounds indicate that they may emulate cytochalasin D and B in the inhibition of actin assembly (25).*

#### **References:**

- (1) Chen, H., Bernstein, B.W., and Bamburg, J.R. (2000). Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem. Sci* 25(1), 19–23.
- (2) Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.
- (3) Perez, E.A. (2009). Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. *Mol. Cancer Ther* 8, 2086–2095.
- (4) Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4, 253-265.
- (5) Montero, A., Fossella, F., Hortobagyi, G., and Valero, V. (2005). Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol* 6, 229-239.
- (6) Gridelli, C., Aapro, M., Ardizzoni, A., Balducci, L., De Marinis, F., Kelly, K., Le Chevalier, T., Manegold, C., Perrone, F., Rosell, R., *et al.* (2005). Treatment of advanced non-small-cell lung cancer in the elderly: results of an international expert panel. *J Clin Oncol* 23, 3125-3137.

(7) Markman, M. (2008). Antineoplastic agents in the management of ovarian cancer: current status and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci* 29, 515-519.

(8) Orr, G.A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., Horwitz, S.B. (2003). Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22(47), 7280-95.

(9) Gunasekera, S.P., Gunasekera, M., Longley, R.E., and Schulte, G.K. (1990). Discodermolide - a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J Org Chem* 55, 4912-4915.

(10) Pettit, G., Cichacz, Z., Gao, F., Boyd, M., and Schmidt, J. (1994). Isolation and structure of the cancer cell growth inhibitor dictyostatin 1. *J Chem Soc Chem Commun*, 1111-1112.

(11) Isbrucker, R.A., Cummins, J., Pomponi, S.A., Longley, R.E., and Wright, A.E. (2003). Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochem Pharmacol* 66, 75-82.

(12) Madiraju, C., Edler, M.C., Hamel, E., Raccor, B.S., Balachandran, R., Zhu, G., Giuliano, K.A., Vogt, A., Shin, Y., Fournier, J.H., *et al.* (2005). Tubulin assembly, taxoid site binding, and cellular effects of the microtubule-stabilizing agent dictyostatin. *Biochemistry* 44, 15053-15063.

(13) Canales, A., Salarichs, J.R., Trigili, C., Nieto, L., Coderch, C., Andreu, J.M., Paterson, I., Jiménez-Barbero, J., and Díaz, J.F. (2011). Insights into the interaction of discodermolide and docetaxel with dimeric tubulin. Mapping the binding sites of microtubule-stabilizing agents using an integrated NMR and computational approach. *ACS Chemical Biology* 6, 789-799.

(14) West, L.M., Northcote, P.T., and Battershill, C.N. (2000). Peloruside A: A potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem* 65, 445-449.

(15) Mooberry, S.L., Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukarn, A., and Davidson, B.S. (1999). Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res.* 59(3), 653-60.

(16) Gaitanos, T.N., Buey, R.M., Díaz, J.F., Northcote, P.T., Teesdale-Spittle, P., Andreu, J.M., and Miller, J.H. (2004). Peloruside A does not bind to the taxoid site on beta-tubulin and retains its activity in multidrug-resistant cell lines. *Cancer Res* 64, 5063-5067.

(17) Buey, R.M., Barasoain, I., Jackson, E., Meyer, A., Giannakakou, P., Paterson, I., Mooberry, S., Andreu, J.M., and Díaz, J.F. (2005). Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chem. Biol.* **12**, 1269-1279.

(18) Pera, B., Razzak, M., Trigili, C., Pineda, O., Canales, A., Buey, R.M., Jiménez-Barbero, J., Northcote, P.T., Paterson, I., Barasoain, I., *et al.* (2010). Molecular Recognition of Peloruside A by Microtubules. The C24 Primary Alcohol is Essential for Biological Activity. *Chembiochem* **11**, 1669-1678.

(19) Pineda, O., Farras, J., Maccari, L., Manetti, F., Botta, M., and Vilarrasa, J. (2004). Computational comparison of microtubule-stabilising agents laulimalide and peloruside with taxol and colchicine. *Bioorg Med Chem Lett* **14**, 4825-4829.

(20) Yoshida, M., Matsui, Y., Ikarashi, Y., Usui, T., Osada, H., and Wakasugi, H. (2007). Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Res* **27**, 729-736.

(21) Kondoh, M., Usui, T., Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Nishikawa, K., Nishikiori, T., Mayumi, T., and Osada, H. (1998). Cell cycle arrest and antitumor activity of pironetin and its derivatives. *Cancer Lett* **126**, 29-32.

(22) Kondoh, M., Usui, T., Nishikiori, T., Mayumi, T., and Osada, H. (1999). Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin. *Biochem J* **340** (Pt 2), 411-416.

(23) Marco, J.A., García-Pla, J., Carda, M., Murga, J., Falomir, E., Trigili, C., Notararigo, S., Díaz, J.F., Barasoain, I. (2011). Design and synthesis of pironetin analogues with simplified structure and study of their interactions with microtubules. *Eur J Med Chem* **46**(5), 1630-7.

(24) Abad, A., Lopez-Perez, J.L., del Olmo, E., Garcia-Fernandez, L.F., Francesch, A., Trigili, C., Barasoain, I., Andreu, J.M., Diaz, J.F., and San Feliciano, A. (2012). Synthesis and antimitotic and tubulin interaction profiles of novel pinacol derivatives of podophyllotoxins. *J Med Chem* **55**, 6724-6737.

(25) Trigili, C., Pera, B., Barbazanges, M., Cossy, J., Meyer, C., Pineda, O., Rodriguez-Esrich, C., Urpi, F., Vilarrasa, J., Diaz, J.F., *et al.* (2011). Mechanism of action of the cytotoxic macrolides amphidinolide X and J. *Chembiochem* 12, 1027-1030.

## **Introducción**



## **1. Patología y farmacología del cáncer.**

La división celular (proliferación) representa un proceso fisiológico controlado en el que una célula inicial (llamada "madre") se divide en dos para formar dos células hijas. Gracias a este proceso los tejidos crecen en los organismos pluricelulares y tiene lugar la reproducción vegetativa en los seres unicelulares. Normalmente la homeóstasis, el equilibrio entre proliferación y muerte celular programada (apoptosis), se mantiene regulando ambos procesos (Jordan et al., 1998) para garantizar la integridad de órganos y tejidos.

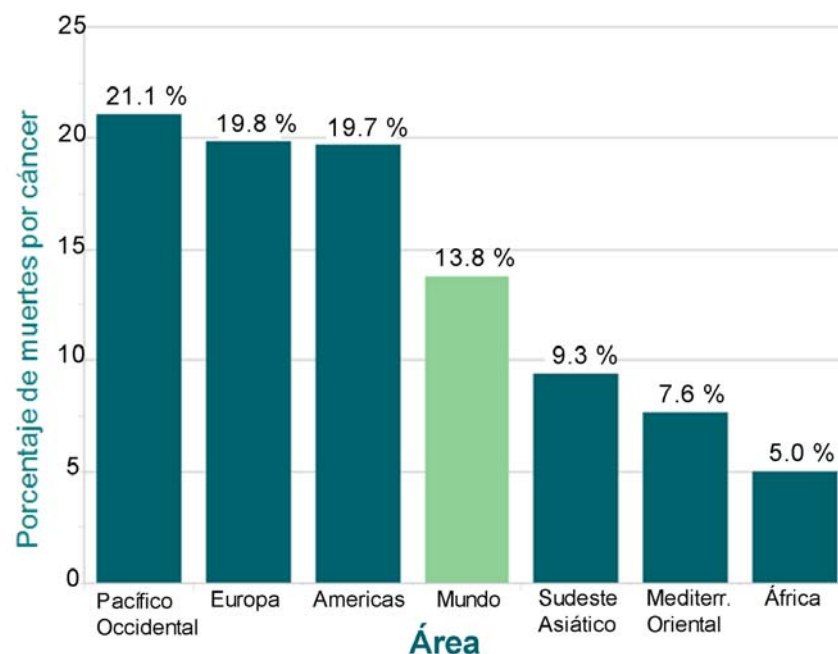
Con el término cáncer se indica un muy amplio y complejo grupo de enfermedades relacionadas, caracterizadas por mutaciones y/o alteraciones que conducen a la destrucción de estos procesos fisiológicos ordenados. La consecuencia es un descontrol que conlleva a una proliferación autónoma, anárquica, irreversible, progresiva y, finalmente, destructiva (Cotran et al., 1999; Jordan et al., 1998). La mayoría de los tumores malignos invaden, a través de las vías linfáticas o hemáticas, los tejidos circundantes y se propagan en el organismo huésped dando lugar a otros tumores malignos denominados metástasis o formaciones neoplásicas secundarias (Stacker et al., 2002), los cuales se encuentran separados y alejados del tumor primario (Gomes et al., 2012; Cotran et al., 1999; Jordan et al., 1998). Las metástasis representan la principal causa de muerte por cáncer (Organización Mundial de la Salud) y diferencian a los tumores malignos de los benignos, que son limitados y no invaden otros tejidos.

En cualquier caso, no es posible pensar en el cáncer como una enfermedad de causa única, sino más bien como el resultado final de una interacción de múltiples factores, entre los cuales se incluyen el medio ambiente, los hábitos alimenticios, la herencia genética, etc. (Colditz et al., 2006). La mayor causa etiológica es el tabaquismo. Cerca del 65 % de los cánceres, de hecho, están causados (35 %) o favorecidos (30 %) por el tabaco y además presentan un peor pronóstico de tratamiento (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades). Además, la incidencia de esta patología aumenta espectacularmente con la edad (Campisi, 2003), muy probablemente

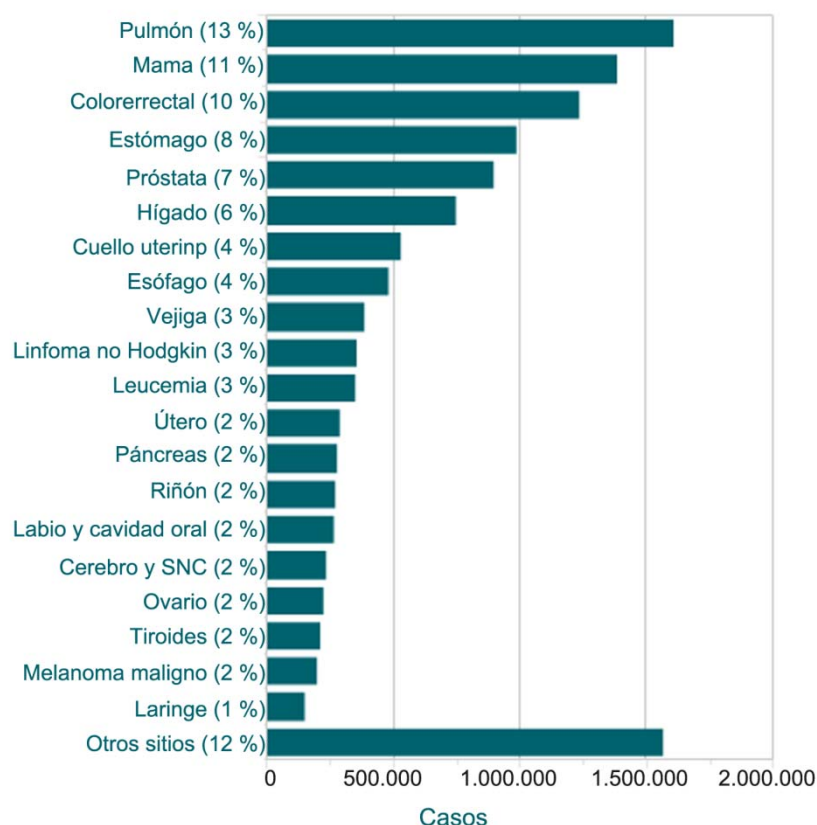


debido a una acumulación de riesgos de cánceres específicos. De hecho el riesgo general se combina con la tendencia de los mecanismos de reparación celular a perder eficacia a medida que la persona envejece.

A nivel mundial, el cáncer representa la primera causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en los países en vías de desarrollo, donde su incidencia es en aumento (Umar et al., 2012). Las estimaciones del 2008 señalaron 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes por cáncer (alrededor del 13 % de todas las muertes) en todo el mundo (Bray et al., 2012; Jemal et al., 2011; Organización Mundial de la Salud) (Tabla 1 y 2).



**Tabla 1.** Porcentaje del total de muertes por cáncer en diversas regiones del mundo. Estimación del 2008. (Modificado de Cancer Research UK).



**Tabla 2.** Los 20 tipos de cáncer más comúnmente diagnosticado en el mundo. Estimación del 2008. (Modificado de Cancer Research UK).

Se prevé que las muertes por cáncer en el mundo seguirán aumentando a más de 13.2 millones en 2030, el 72 % más que en 2008 (Organización Mundial de la Salud).

### 1.1. Las distintas modalidades de tratamiento del cáncer.

Las armas de las que dispone la medicina para luchar contra la enfermedad neoplásica son varias, e incluyen principalmente la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Los diversos tipos de tratamiento no son mutuamente excluyentes y, a menudo, en función de los diferentes casos, se pueden utilizar simultáneamente o secuencialmente (Lake and Robinson, 2005). El avance obtenido en la curación, la supervivencia y la calidad de vida ha sido consecuencia del manejo multidisciplinario de esta enfermedad combinando las distintas modalidades de tratamiento (Asociación Española contra el Cáncer), dando a cada técnica su valor específico en su momento oportuno.

Además existen algunos otros tratamientos, utilizados en el caso de algunos tumores específicos, tales como la inmunoterapia, el tratamiento con láser o la hormonoterapia (por ejemplo aplicada en cánceres de mama o próstata).

En la mayoría de las situaciones, la principal opción es la cirugía (De la Cruz Caro, 1968; Sakorafas and Safioleas, 2009), que se suele utilizar en casi todos los tipos de tumores sólidos (sarcomas, carcinomas, etc.). No obstante, en algunas circunstancias, antes de la cirugía se debe utilizar radioterapia y/o quimioterapia para reducir la masa del tumor y facilitar la tarea del cirujano, haciendo además que este tipo de aplicación sea en la mayoría de los casos mucho menos traumática de lo que solía serlo hace unos años.

Según algunos autores, el papel de la oncología quirúrgica consiste hoy en día en seis áreas diferentes (American Cancer Society):

- Cirugía radical.
- Cirugía citorreductora.
- Resección de las lesiones metastásicas.
- Urgencia oncológica.
- Resección paliativa.
- Cirugías reconstructivas y rehabilitación.

La radioterapia es una práctica médica nacida hace alrededor de un siglo atrás gracias al descubrimiento de los rayos X por parte del físico alemán Wilhelm C. Röntgen (1845-1923) (Röntgen, 1895). Es un proceso destinado principalmente al tratamiento del cáncer, aunque en algunos casos se utiliza para tratar enfermedades no neoplásicas (exoftalmos de hipertiroidismo, enfermedad de Dupuytren, enfermedad de Peyronie, neurinomas del acústico, meningiomas, hemangioma vertebral, neuralgia del trigémino idiopática, etc.).

En oncología, los tratamientos de radioterapia se realizan mediante radiaciones ionizantes (rayos X, electrones, protones, etc.) (Kaplan, 1970) directamente sobre la masa del tumor. Estas radiaciones dañan el ADN celular y, como consecuencia, las células cancerosas se verán más afectadas ya que suelen encontrarse alterados sus mecanismos de reparación del ADN (Negrini et al., 2010). El tratamiento es indoloro y por lo general dirigido a regiones bien

definidas del organismo. Se basa esencialmente en el principio de que la radiación de alta energía utilizada es capaz de producir la muerte de las células cancerosas, deteniendo así el proceso de proliferación. Desafortunadamente, este tratamiento no le hace daño sólo a las células enfermas, sino también a aquéllas que pertenecen al tejido sano cercano a la zona sometida a la irradiación (Barnett et al., 2009).

Un porcentaje muy elevado de todos los pacientes con cáncer reciben radioterapia ya sea sola o en combinación con otras modalidades de tratamiento, como la cirugía o la quimioterapia (Bernier et al., 2004; Delaney et al., 2005; Lake and Robinson, 2005).

En general los objetivos que se pretenden alcanzar con la radioterapia son de diferentes tipos:

- Destrucción total de todas las células tumorales con el fin de obtener una curación completa.
- Reducción de la masa tumoral con el fin de facilitar la intervención del cirujano.
- Prevención de la recurrencia del tumor después de otros tipos de tratamiento (por ejemplo, la cirugía o la quimioterapia).
- Control de los síntomas relacionados con enfermedades malignas (paliativos).

La quimioterapia (Chabner and Roberts, 2005; Scott, 1970) es una forma de intervención que se utiliza para combatir las formaciones neoplásicas mediante la administración de los llamados fármacos antitumorales (a veces referido como fármacos citotóxicos o antineoplásicos) (Dorland, 2003), cuyo efecto consiste en bloquear la rápida replicación celular que caracteriza a los tumores malignos (Jordan et al., 1998). En aras de la equidad, por lo tanto, se debería hablar más específicamente de *quimioterapia antitumoral* o *quimioterapia contra el cáncer*. En todo caso, su finalidad puede variar en función de las circunstancias del paciente, pudiendo tratarse de una terapia curativa o paliativa. En ocasiones no se administra como tratamiento único, pudiendo ser según el caso neoadyuvante, concomitante o adyuvante.

En general, la quimioterapia es muy eficaz en algunos tipos de cáncer, pero también se caracteriza por fuertes efectos secundarios, ya que los

fármacos citotóxicos no tienen la capacidad de distinguir las células sanas de las que están enfermas. En una infección bacteriana encontrar fármacos efectivos es relativamente sencillo debido a la cantidad de dianas diferenciales que existen entre el patógeno y su hospedador, aunque resulta más difícil en el caso de parásitos eucariotas en los que no hay casi diferencias en este sentido (Perry, 2008). En el caso del cáncer, no existen diferencias químicas entre las células "patógenas" y las sanas, puesto que ambos tipos proceden del propio organismo del paciente. Las drogas que se usan en los tratamientos quimioterapéuticos deben distinguir por tanto un comportamiento y no una diana exclusiva. Dicho comportamiento diferencial reside en el ritmo de división celular (Jordan et al., 1998; Skipper, 1979). De todas formas, el efecto de este tratamiento no es consistente con el grado de índice mitótico de los tumores, que no suele ser superior al 3-5 %. Es importante considerar que la quimioterapia también actúa por inhibición de la angiogénesis (crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que los tumores necesitan para crecer), sobre todo en los tumores sólidos. Como se describirá más adelante, los más activos en esta faceta son los inhibidores del huso mitótico (Dumontet and Jordan, 2010; Lippert, 2007; Zhou and Giannakakou, 2005), que al no afectar al ADN no son cancerígenos.

De todos estos tratamientos descritos, mientras la cirugía y la radioterapia son tratamientos locales, la quimioterapia, así como la hormonoterapia (utilización de fármacos bloqueantes de hormonas que impiden que tumores hormona-dependientes puedan crecer) son procedimientos con carácter sistémico (Perry, 2008), pues se basan en la administración de fármacos al torrente sanguíneo. La quimioterapia sigue siendo la opción de tratamiento más común para pacientes con cáncer (Lai et al., 2012) y la más indicada en procesos metastáticos (Asociación Española Contra el Cáncer).

#### **1.1.1. Quimioterapia antitumoral.**

A pesar de los grandes esfuerzos y avances realizados en su tratamiento en las últimas dos décadas, el cáncer sigue siendo un grave problema de salud pública. El enorme interés en el conocimiento de esta enfermedad desde

enfoques muy diferentes, dada la complejidad del proceso a nivel bioquímico y la variedad de etiologías, se ha traducido en un extenso y exhaustivo estudio biológico y farmacológico destinado a desarrollar nuevos fármacos quimioterapéuticos que, de forma selectiva, eliminen las células enfermas. De hecho, no existe un único tipo de compuesto que pueda ejercer una acción curativa en todos los casos (Boyle and Goldspiel, 1998; Gibbs, 2000).

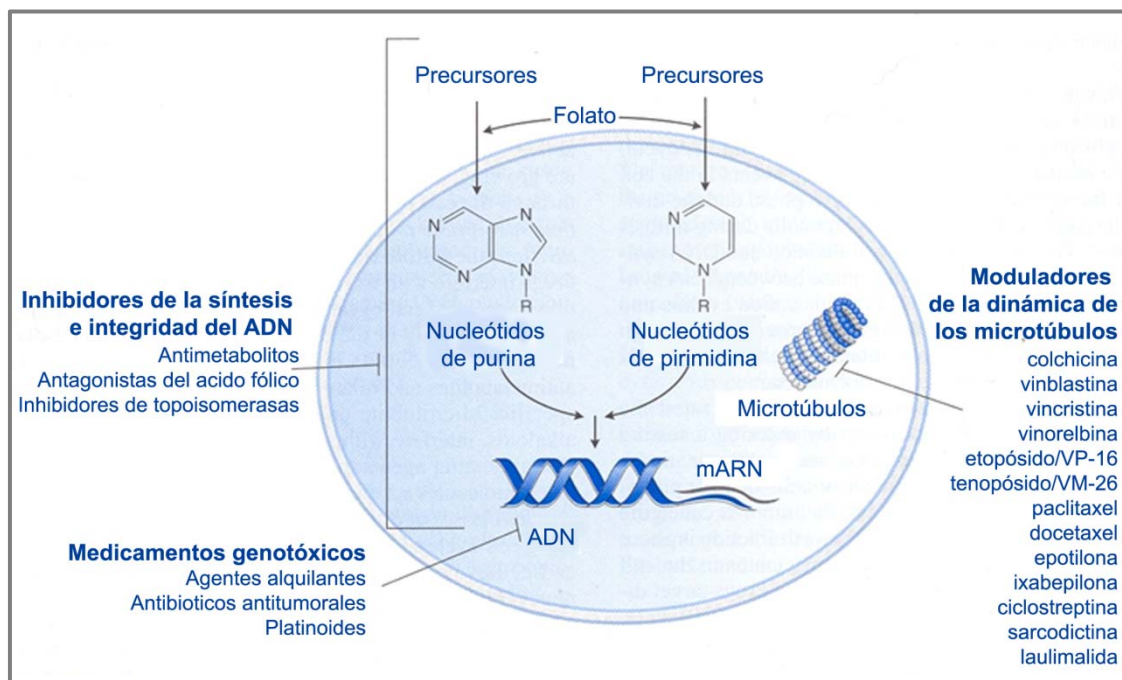
El mayor problema a superar en el descubrimiento de nuevos agentes quimioterapéuticos efectivos contra el cáncer es, como se ha descrito anteriormente, la similitud bioquímica de la célula tumoral con respecto a la sana. Sin embargo, las células cancerosas pierden la mayor parte de las funciones reguladoras (alteraciones en los protooncogenes, pérdida de la función de los genes supresores de tumores, etc.) (Hanahan and Weinberg, 2011) presentes en las células sanas y siguen dividiéndose, incluso en condiciones en las que las células normales bloquean este proceso. Como consecuencia, aunque el tratamiento quimioterapéutico sea limitado, este comportamiento celular hace que las células cancerosas sean más vulnerables a muchos agentes citotóxicos de manera que su desregulación se convierta en la diana de la quimioterapia antitumoral (Jordan et al., 1998). No obstante, no todas las células sanas bloquean este proceso de división, lo que contribuye a la toxicidad del tratamiento en determinados órganos con cierta especificidad (pulmón, hígado, riñón y estructuras nerviosas) (Leza et al., 2005) y a los efectos secundarios en aquellas células que normalmente se dividen rápidamente (médula espinal, mucosa oral y gastrointestinal, folículo piloso, ovario y testículo).

A día de hoy existen al menos cien drogas diferentes utilizadas en la lucha contra el cáncer que actúan causando muerte celular de diversas maneras. El tratamiento utilizado varía y depende de un gran número de factores que incluyen el tipo, la localización y la extensión de la enfermedad, al igual que el estado de salud del paciente.

Algunos de estos fármacos son compuestos naturales y otros son productos químicos sintéticos. La vía común por la que estos agentes ejercen

su efecto citotóxico en la célula es la inducción de apoptosis como respuesta a la aparición de daños irreparables en las células (Fesik, 2005).

Los fármacos quimioterapéuticos más comúnmente utilizados pueden dividirse principalmente en dos grandes grupos según sus dianas de acción: agentes que interfieren en la biosíntesis del ADN, bien obstaculizando su síntesis, bien introduciendo alteraciones en él; o compuestos que actúan en la maquinaria de replicación celular inhibiendo la función del huso mitótico y, como consecuencia, interrumpiendo la mitosis (Dumontet and Jordan, 2010) (Figura 1).



**Figura 1.** Diferentes niveles de actuación de compuestos antineoplásicos. (Fuente: Taylor and Reide, 2001).

El primer grupo acoge los medicamentos que interfieren con la formación de biomoléculas fundamentales en la célula, como los antagonistas del ácido fólico (metotrexato) (Jolivet et al., 1983; Kaye, 1998; Collier et al., 1957) o de nucleótido ((6-mercaptopurina (6MP), fludarabina, 5-fluorouracilo (5FU), gemcitabina)) (Karran and Attard, 2008) y los inhibidores de las topoisomerasas I (irinotecan) y II (antraciclinas). También se incluyen los fármacos que generan

aductos de ADN (cisplatino, carboplatino) (Rosenberg et al., 1965), los agentes alquilantes (mostaza nitrogenada, ciclofosfamida) que interrumpen la horquilla de replicación en la fase S (Al-Minawi et al., 2009; Koç et al., 2004; Paulovich and Hartwell, 1995) y los antibióticos citotóxicos que intercalándose entre las parejas de bases de ADN inhiben la síntesis de ARN (dactinomicina). La consecuencia de exposiciones repetidas de la célula a estos agentes conlleva la activación de un proceso de apoptosis (Bagnyukova et al., 2010).

El segundo grupo incluye una amplia gama de fármacos quimioterapéuticos cuyo objetivo es interferir en la división celular para inhibir la proliferación desmesurada de las células tumorales, induciendo mitosis aberrantes que llevan a una parada en mitosis y la subsecuente muerte celular (Morris and Fornier, 2008). Tradicionalmente, la diana de estas drogas ha sido representada por proteínas que coordinan la formación del huso mitótico y la dinámica cromosómica, así como las que forman el huso en sí, siendo la más destacada de éstas últimas la tubulina (unidad fundamental de los microtúbulos del citoesqueleto, que se describirá en detalle más adelante) (Dumontet and Jordan, 2010). Este tipo de agentes, en particular los moduladores de microtúbulos, representan una de las familias de compuestos más usada en quimioterapia contra el cáncer (Chen et al., 2010), de los cuales todavía queda mucho por descubrir. De este modo, hablamos de compuestos dirigidos contra las quinesinas mitóticas, implicadas en la organización de los polos del huso y el alineamiento de los cromosomas (Miki et al., 2005), así como de agentes dirigidos contra las quinasas mitóticas, íntimamente implicadas en la maduración y separación del centrosoma durante la profase temprana (Kinoshita et al., 2005; Liu & Ruderman, 2006).

El presente trabajo aborda el estudio y la caracterización del modo de acción de algunos de estos moduladores, con el objetivo, por un lado, de profundizar en el conocimiento de estas estructuras celulares de importancia vital en los procesos de división celular y, por otro, por las futuras posibles aplicaciones que pudieran tener en el campo de la quimioterapia contra el cáncer.



## 1.2. Inmunoterapia.

Considerando que la terapia contra el cáncer se ha basado siempre en la cirugía, radioterapia y quimioterapia, la aparición de la inmunoterapia supuso una evolución en el tratamiento de dicha patología (Richardson et al., 1999).

La inmunoterapia (también llamada terapia biológica o bioterapia) es un tipo de tratamiento para el cáncer que utiliza el sistema inmunológico del organismo para combatir esta enfermedad (Dillman, 2011; Sharma et al., 2011).

Los médicos y los investigadores no están seguros sobre la forma en que la inmunoterapia trata el cáncer. Sin embargo, piensan que puede actuar de diferentes maneras:

- Detener o retrasar el crecimiento de las células cancerosas.
- Impedir que el cáncer se disemine a otras partes del organismo.
- Ayudar a que el sistema inmunológico sea más eficaz en la eliminación de las células cancerosas.

Durante mucho tiempo, los médicos sospecharon que el sistema inmunológico tenía un efecto sobre ciertos tipos de cáncer. Incluso antes de que el sistema inmune se conociera mejor, William B. Coley (1862-1936), un cirujano del *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center* de Nueva York, señaló que contraer una infección después de la cirugía parecía ayudar a la regresión del mismo cáncer (Nauts, 1989; Richardson et al., 1999). Como consecuencia, a finales de 1900 empezó a tratar a los pacientes con un extracto bacteriano, la toxina de Coley (Wiemann and Starnes, 1994). Aunque tuvo cierto éxito, su técnica se vio ensombrecida cuando otras formas de tratamiento, como la radioterapia, entraron en uso.

Desde entonces, los médicos aprendieron mucho sobre el sistema inmunológico (Bast et al., 1974; Cole and Everson, 1956; Montie et al., 1977; Vosika, 1983). Este conocimiento llevó a la investigación a preguntarse, desde enfoques muy diferentes, de qué manera se podía utilizar la inmunoterapia como tratamiento contra el cáncer.

Se conocen varios tipos de inmunoterapia, incluyendo los anticuerpos monoclonales, las inmunoterapias no específicas y las vacunas contra el cáncer.

- Anticuerpos monoclonales (Scott et al., 2012). Proteínas del sistema inmune producidas en laboratorio que pueden ser muy útiles en el tratamiento del cáncer, ya que pueden ser diseñadas para atacar a una parte específica de una célula enferma (Instituto Nacional del Cáncer). Ejemplos de anticuerpos monoclonales son: bevacizumab (Avastin®); trastuzumab (Herceptin®); rituximab (Rituxan®).
- Inmunoterapias no específicas. Estos tratamientos estimulan el sistema inmune de una manera muy general y este hecho puede dar lugar a una mayor actividad contra las células cancerosas. Las inmunoterapias no específicas utilizan diferentes tipos de citoquinas (o citocinas), un grupo heterogéneo de pequeños polipéptidos solubles que regulan numerosas funciones fisiológicas críticas, tales como la maduración y diferenciación celular (Borish and Steinke, 2003), la inflamación y la respuesta inmune local y sistémica (Rosenberg et al., 2001). Los dos tipos de citocinas más ampliamente usadas en el tratamiento del cáncer son los interferones (Isaacs and Lindenmann, 1957; Isaacs et al., 1957), tales como el interferón alfa (Roferon-A [2a], Intron A [2b], Alferon N) y las interleucinas, como la interleuquina-2 (IL-2) (Rosenberg, 1988), o la versión sintética de ésta, la aldesleuquina (Proleukin®).
- Vacunas contra el cáncer: Las vacunas son sustancias introducidas en el organismo para iniciar una respuesta inmune contra ciertas enfermedades. Se suele pensar en ellas como atención hacía las personas sanas para ayudar a prevenir las infecciones (Gardasil®). Sin embargo, algunas vacunas pueden también ayudar a prevenir (Lollini et al., 2006) o tratar el cáncer.

En general, la inmunoterapia parece funcionar mejor para algunos tipos de cáncer que para otros. Se utiliza como tratamiento único en algunos tipos de cáncer, aunque en la mayoría de los casos parece dar mejores resultados cuando es utilizada junto con otras terapias previamente descritas (Lake and Robinson, 2005).

## **2. Citoesqueleto y sus componentes.**

La imagen de una célula eucariota estática dentro de la cual, en compartimientos específicos, se desarrollan los elaborados procesos que caracterizan sus funciones es engañosa. De hecho, las células no constituyen ladrillos rígidamente posicionados en la construcción del organismo, sino que pueden moverse y cambiar de forma. Estos movimientos están mediados por un citoesqueleto interno a las células formado principalmente por tres sistemas de fibras diferentes: filamentos intermedios, microfilamentos y microtúbulos (Herrmann et al., 2009; Dràber et al., 2012). Dichos componentes son de tipo polimérico y sus ciclos de polimerización y despolimerización permiten a la célula variar, dentro de ciertos límites, su propia forma de manera reversible.

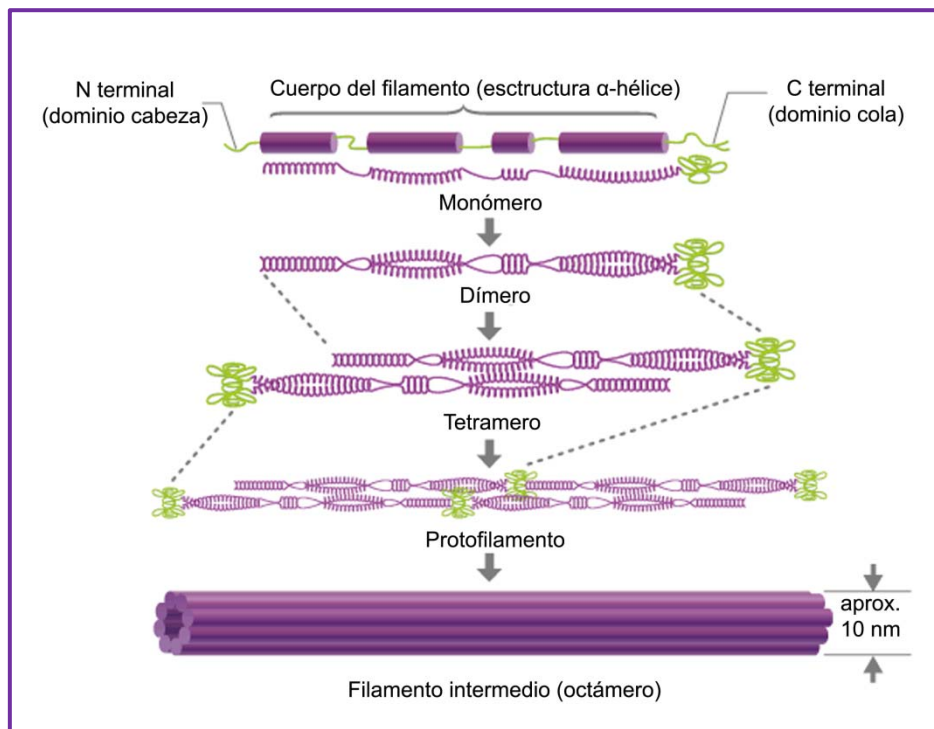
### **2.1. Filamentos intermedios.**

Los filamentos intermedios son fibras proteicas resistentes parecidas a cuerdas que desempeñan una función estructural o mecánica en la célula (Lazarides, 1982). Se denominan intermedios porque su diámetro es de aproximadamente 10-12 nm (Eriksson et al., 2009; Ishikawa et al., 1968; Rice et al., 1970; Schmitt, 1968), entre los de los microfilamentos (7-8 nm) y los de los microtúbulos (25 nm).

Se encuentran presentes en las células animales (Herrmann et al., 2009), aunque no en todas. Forman una red que contacta con el núcleo y se extiende hasta la periferia celular. Normalmente están anclados a los complejos de unión que se establecen entre células vecinas (Herrmann and Aebi, 2004). También se han encontrado en el núcleo donde forman la lámina nuclear (Herrmann et al., 2007), un entramado que da forma y aporta cohesión a la envuelta nuclear.

En los humanos hay 70 genes (Szeverenyi et al., 2008) que codifican para los monómeros de los que están formados los filamentos intermedios. Estos monómeros están constituidos por una cabeza globular en el extremo amino, una cola globular en el extremo carboxilo y un dominio central con unos 310 a 350 aminoácidos (Herrmann and Aebi, 2004). Esta última región se

organiza en una hélice  $\alpha$  que permite a un monómero unirse a otro para formar dímeros (Parry, 1982). Dos de estos dímeros pueden asociarse entre sí de forma antiparalela para formar tetrámeros, y estos a su vez se asocian entre sí cabeza con cola formando octámeros. Cuatro octámeros forman la unidad fundamental de ensamblaje y varias unidades se asocian por sus extremos para formar los filamentos intermedios a modo de cuerda (Herrmann et al., 1996; Steinert et al., 1993a-b; Hess et al., 2004; Mucke et al., 2004) (Figura 2).



**Figura 2.** Etapas de la polimerización de los filamentos intermedios. Dos unidades básicas (monómeros) se asocian en la misma dirección para formar un dímero. Dos dímeros se alinean cabeza-cola para formar un tetrámero, con las dos hebras ligeramente desplazadas en sus direcciones opuestas. Los tetrámeros se alinean para formar un protofilamento. Ocho protofilamentos se unen para formar un filamento intermedio con un diámetro de aproximadamente 10 nm. (Modificado de Asashima et al., 2010).

Las zonas centrales de los monómeros son muy parecidas en tamaño y secuencia de aminoácidos entre los distintos tipos de filamentos intermedios, por lo que todos tienen forma y diámetro parecidos. Las cabezas o zonas

globulares son las regiones de la proteína encargadas de interaccionar con otros componentes celulares, aunque en los distintos tipos de filamentos intermedios estas cabezas son variables en forma y secuencia de aminoácidos (Herrmann et al., 2009).

Los filamentos intermedios son flexibles y resistentes, dos propiedades óptimas para soportar las tensiones mecánicas de las células. Además de esta función de resistencia, intervienen en otros procesos celulares: se les postula como lugar de anclaje de numerosas moléculas de señalización y de interaccionar directamente con orgánulos como las mitocondrias, el aparato de Golgi y los lisosomas (Tasaka, 1994), pudiendo afectar de esta manera al funcionamiento de los mismos.

Aunque los filamentos intermedios son más estables en el tiempo que los microtúbulos o los microfilamentos, también pueden desorganizarse y volver a polimerizar bajo ciertas condiciones celulares (Eriksson et al., 2009) tales como durante el desplazamiento celular, división celular, o cuando se responde a cambios de dirección de las fuerzas tensoras que soportan las células (Izushi et al., 1992).

Hay tres grandes familias de filamentos intermedios: la vimentina (Kreis and Vale, 1999) y otros filamentos relacionados que aparecen en las células del conjuntivo, nerviosas y musculares; los filamentos de queratina en las células epiteliales; y los neurofilamentos que se encuentran en las células nerviosas. La familia de filamentos intermedios con más diversidad en sus monómeros es la de las queratinas.

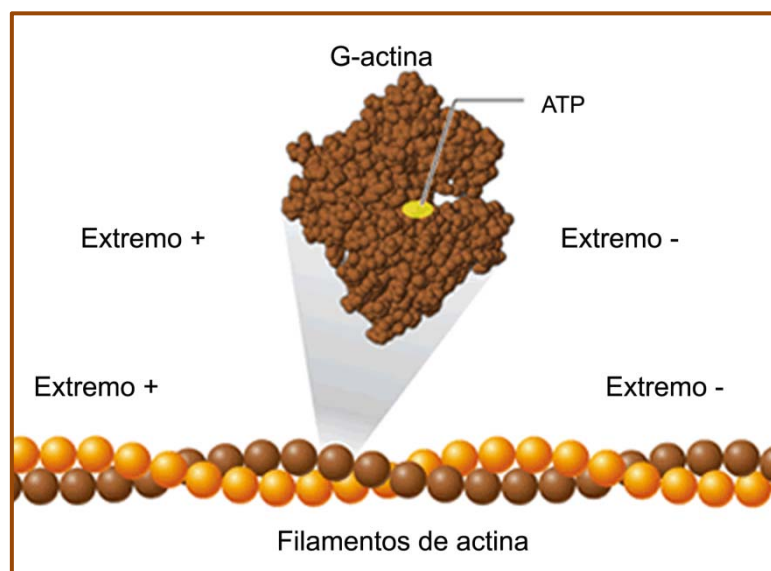
## **2.2. Actina y microfilamentos.**

La actina es una proteína citosólica muy abundante (Oda et al., 2009), representando aproximadamente el 10 % del total de las proteínas citosólicas. Una proporción de esas moléculas de actina se encuentra formando parte de los filamentos (F-actina) y el resto son proteínas no polimerizadas (G-actina) disueltas en el citosol (Heinrichs, 2009).

Los microfilamentos (o filamentos de actina) se encuentran normalmente localizados cerca de la membrana plasmática en las células animales. Se

forman por la polimerización de dos tipos de proteínas globulares:  $\alpha$ -actina y  $\beta$ -actina (Kreis and Vale, 1999), siendo esta última la más frecuente y presente en la mayoría de las células eucariotas. Además, su secuencia de aminoácidos difiere ligeramente de la  $\alpha$ -actina, la cual abunda en el músculo.

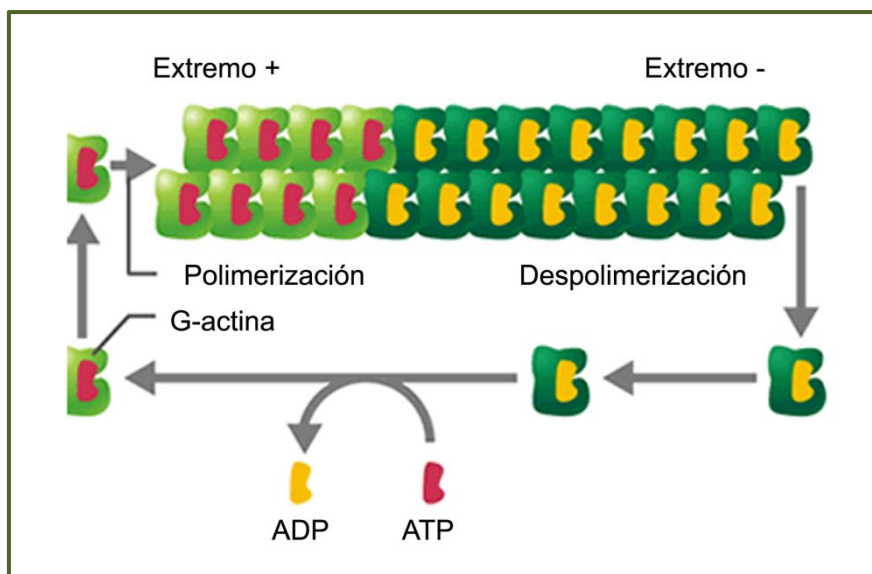
Los filamentos de actina poseen unos 7 nm de diámetro y son filamentos polarizados (Allard and Mogilner, 2012). Estas características son consecuencia de la disposición ordenada de las moléculas de actina en el filamento, ya que siempre se ensamblan con la misma orientación. El extremo positivo se denomina así porque en él predomina la polimerización (adición de nuevas moléculas de actina), mientras que en el extremo negativo predomina la despolimerización (Figura 3).



**Figura 3.** G-actina (unidad básica de los filamentos de actina) y F-actina (polímeros de moléculas de G-actina). Cada filamento de actina tiene dos hélices trenzadas de moléculas de G-actina polimerizadas. (Modificado de Asashima et al., 2010).

Una de las grandes ventajas de estas fibras es la versatilidad con que se crean y se destruyen (Allard and Mogilner, 2012) (Figura 4), así como su capacidad de asociarse y formar estructuras tridimensionales muy diferentes. Estas características tienen lugar gracias a las denominadas proteínas moduladoras de la actina (Arp2/3 o las forminas que actúan como centros

nucleadores), las cuales afectan a la velocidad de creación y destrucción de filamentos, a la velocidad de polimerización y a su disposición tridimensional (Chan et al., 2009; Goley and Welch, 2006). De hecho, prácticamente no existen ni microfilamentos, ni proteínas de actina “desnudos” en el citosol, sino siempre unidos a alguna proteína moduladora. Esta circunstancia es tremendamente útil para la célula, puesto que permite crear nuevos filamentos solo allí donde se necesitan.



**Figura 4.** Formación de los filamentos de actina y reciclaje de G-actina. La molécula de G-actina más el ATP se une al extremo positivo de los filamentos de actina. La hidrólisis del ATP facilita la despolimerización, lo que es igual a la eliminación de moléculas de G-actina a partir de su extremo negativo. Si el ADP de la G-actina disociada se intercambia con el ATP, la G-actina es capaz de volver a polimerizar. (Modificado de Asashima et al., 2010).

Los filamentos de actina están implicados en un gran número de funciones celulares: endocitosis y fagocitosis, estrangulamiento final del citoplasma durante el proceso de división celular, movilidad lateral de las proteínas de membrana, etc. (Pendleton and Koffer, 2001; Revenu et al., 2004).

Es importante destacar la importancia de estas fibras en la migración celular (Allard and Mogilner, 2012). Las células eucariotas son capaces de llevar a cabo movimientos de traslocación sobre una superficie. Este tipo de

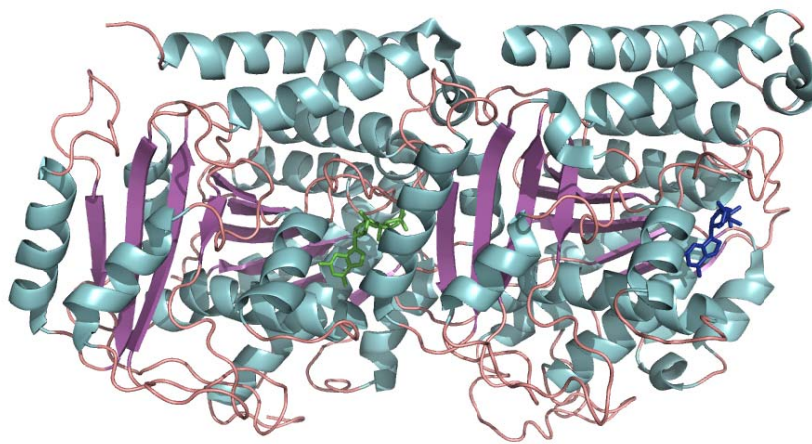
movimiento representa la forma más básica de locomoción celular, empleada por varios tipos de células: desde el movimiento de protozoos, la migración de las células embrionarias durante el desarrollo, la invasión de los tejidos por los glóbulos blancos para combatir una infección, la migración de las células implicadas en la cicatrización de las heridas y sobre todo, dramáticamente, la propagación de las células cancerosas durante el desarrollo de metástasis (Revenu et al., 2004). Por tanto, los microfilamentos pueden favorecer la aparición de formaciones neoplásicas secundarias en diferentes órganos y, como consecuencia, representar una diana de gran interés en la búsqueda de fármacos antitumorales que limiten y/o superen estos graves problemas.

### **2.3 Tubulina y microtubulos.**

La tubulina, proteína globular de 100 kDa (Krauh et al., 1981; Ponstingl et al., 1981), constituye el componente principal de los microtúbulos. El descubrimiento de dicha proteína se acopló íntimamente con la identificación del sitio de unión a la colchicina, el primer agente antimitótico identificado (Weisenberg et al., 1968).

Comúnmente, se denomina tubulina a un heterodímero formado por dos proteínas globulares homólogas,  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, que comparten cerca del 40 % de identidad de secuencia (Ludueno, 1998) y cuyas estructuras terciarias son muy similares (Figura 5).

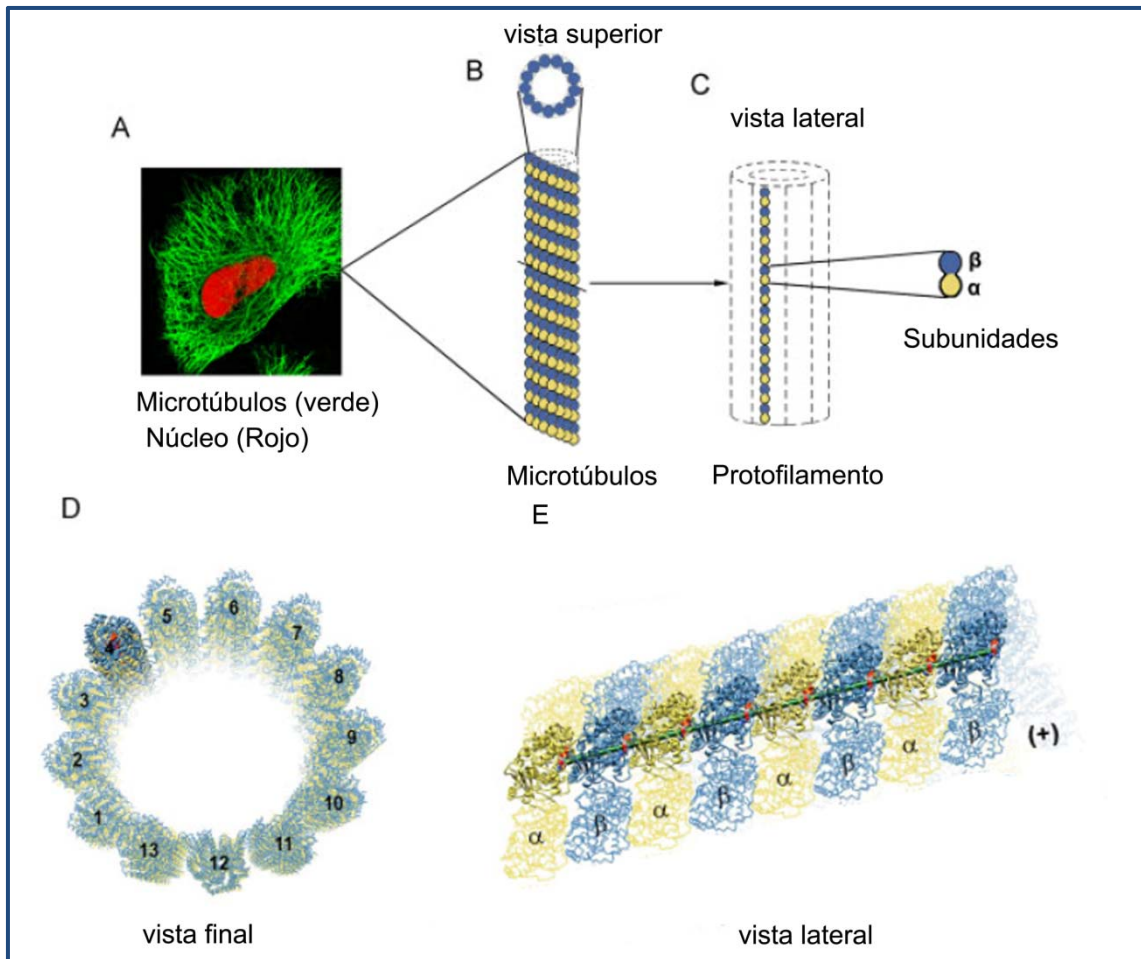




**Figura 5.** Estructura del heterodímero de tubulina. Diagrama de cintas mostrando las hélices  $\alpha$  en celeste, las láminas  $\beta$  en morado y los *loops* en rosa. La subunidad  $\alpha$ -tubulina (monómero de la derecha) contiene una molécula de GTP (azul marino) unido, mientras que la subunidad  $\beta$ -tubulina contiene una molécula de GDP (verde). Archivo 1JFF del Protein Data Bank (PDB).

Los microtúbulos constituyen un componente del citoesqueleto que tiene un papel organizador interno crucial en todas las células eucariotas. Son largos polímeros filamentosos e intrínsecamente robustos que resisten a la compresión y flexión. Son estructuras tubulares de 25 nm de diámetro exterior y unos 12 nm de diámetro interior, con longitudes que varían entre unos pocos nm a  $\mu\text{m}$ . La unidad biológica de los microtúbulos en solución la constituye el heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina (Downing and Nogales, 1998; Nogales, 2000).

La polimerización de los microtúbulos tiene lugar mediante un mecanismo de nucleación-elongación, en el que la formación relativamente lenta de un pequeño núcleo es seguida de un crecimiento rápido del microtúbulo gracias a la adición reversible y no covalente de dímeros de tubulina en sus extremos (Jordan and Wilson, 2004). Los dímeros interaccionan cabeza con cola para formar protofilamentos rectos ((entre 9 y 16 dependiendo de las condiciones (Chrétien and Wade, 1991); *in vivo* generalmente 13 (Alberts et al., 1994)) que posteriormente se asocian de forma paralela y ligeramente desplazada (alrededor de 0.9 nm), estableciendo contactos laterales entre ellos para formar la pared cilíndrica de los microtúbulos (Amos and Klug, 1974; Zhou and Giannakakou, 2005) (Figura 6).



**Figura 6.** **A:** Célula humana HeLa de carcinoma de cérvix. Los microtúbulos (en verde) están marcados con FITC; el núcleo (en rojo) está marcado con DAPI. **B:** Representación esquemática de los 13 protofilamentos asociados lateralmente para formar la pared cilíndrica del microtúbulo. **C:** Representación esquemática del dímero  $\alpha,\beta$ -tubulina. Los monómeros están representados como esferas de diferentes colores ( $\alpha$ -tubulina amarillo,  $\beta$ -tubulina azul). Los dímeros interaccionan linealmente cabeza-cola para formar los protofilamentos. **D:** Modelo de resolución atómica de los 13 protofilamentos que forman los microtúbulos. **E:** Vista lateral de este modelo. Se muestra en detalle un protofilamento recto, con los nucleótidos (GDP o GTP de cada monómero de tubulina). El eje recto (verde) indica el vector de crecimiento de los microtúbulos hacia el extremo positivo. (Modificado de Stanton et al., 2011).

Cada protofilamento tiene una polaridad estructural: la  $\alpha$ -tubulina siempre formará un extremo del protofilamento y la  $\beta$  el otro. Esta polaridad es la misma para todos los protofilamentos de un microtúbulo y, por tanto, puede decirse que el microtúbulo es también una estructura polarizada (Walker et al.,

1988). Se denomina extremo negativo al extremo donde se localiza una  $\alpha$ -tubulina y extremo positivo donde se ubica la  $\beta$ -tubulina. Los nuevos dímeros de tubulina se añaden con una menor afinidad a la  $\alpha$ -tubulina que a la  $\beta$ , por lo que el extremo positivo es el lugar preferente de crecimiento del microtúbulo y, por tanto, donde predomina la polimerización respecto a la despolimerización. En el extremo negativo predomina la despolimerización respecto a la polimerización. Por ello, los microtúbulos suelen crecer por el extremo positivo y, si no está protegido, decrecer por el extremo negativo. En la célula, los microtúbulos están anclados por sus extremos negativos al centrosoma creciendo a partir del anillo de  $\gamma$ -tubulina, mientras que los extremos positivos están libres en el citoplasma y se dirigen hacia la periferia (Orr et al., 2003).

Es importante destacar que los microtúbulos no son simple polímeros de equilibrio (Cassimeris et al., 1987; Margolis and Wilson, 1998) y que sus funciones biológicas en todas las células están determinadas y reguladas en gran parte por su dinámica de polimerización (Waterman-Storer and Salmon, 1997).

### **2.3.1. Dinámica de los microtúbulos.**

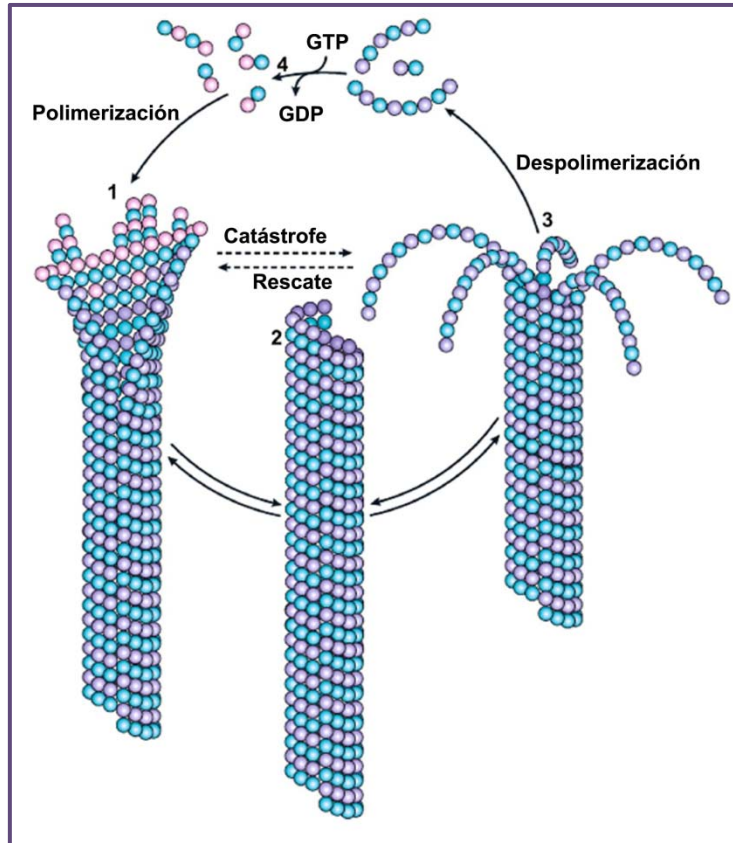
En un fibroblasto típico, una mitad de la tubulina disponible está libre en el citosol y la otra mitad formando parte de los microtúbulos. Esta situación es bastante diferente a la de los filamentos intermedios, en los que la mayoría de las subunidades están formando parte de dichos filamentos. En el caso de la tubulina, hay un intercambio de dímeros entre el citosol y los microtúbulos, que resulta importante para la reordenación del sistema celular de estos polímeros si es necesario.

Una vez que se ha producido el comienzo de la formación de un microtúbulo, la incorporación de nuevos dímeros de tubulina hacen que éste crezca en longitud. A veces, este crecimiento se detiene repentinamente y el microtúbulo comienza a despolimerizarse, llegando incluso en ocasiones a desaparecer o más frecuentemente a reiniciar el proceso de polimerización (Hotani and Horio, 1988; Kirschner and Mitchison, 1986). Estas alternancias

entre polimerización y despolimerización se denominan inestabilidad dinámica (Walker et al., 1988; Cassimeris, 1993; Desai and Mitchison, 1997; Cassimeris et al., 1987). Dicho comportamiento se caracteriza principalmente por cuatro variables: la relación de crecimiento, la de acortamiento, la frecuencia de transición entre el crecimiento o el estado estable al acortamiento (catástrofe) y la frecuencia de la transición opuesta (rescate) (Walker et al., 1988).

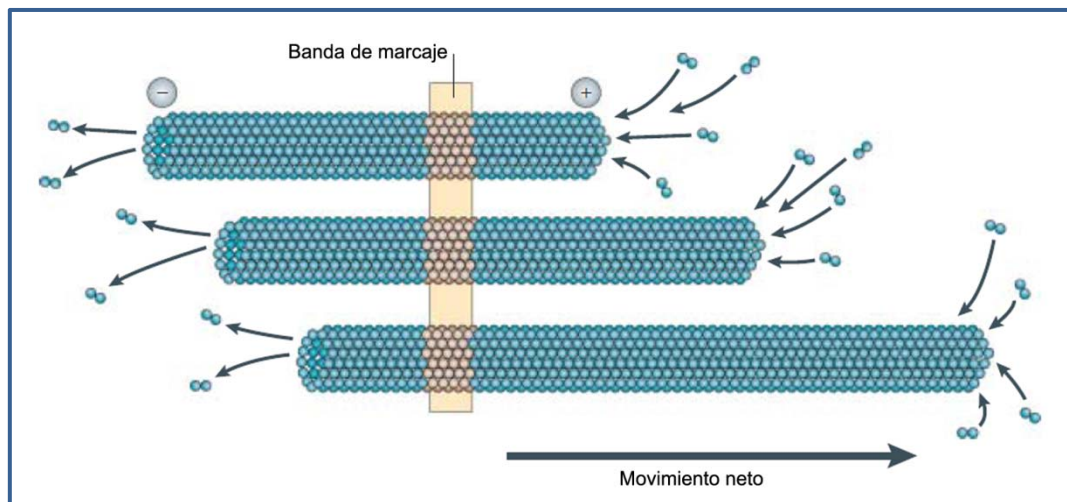
Los dímeros de tubulina libres en el citoplasma se encuentran unidos a una molécula de GTP (Weisenberg et al., 1968). Cuando un dímero se une a un microtúbulo en crecimiento se produce la hidrólisis de GTP a GDP. Si la velocidad con la que se produce la unión de nuevos dímeros es mayor que la de hidrólisis del GTP siempre habrá un conjunto de dímeros en el extremo positivo que tendrán GTP unido. A este conjunto de dímeros-GTP polimerizado se le llama “tapón” de GTP (Carlier et al., 1991; Jordan and Wilson, 2004; Stanton et al., 2011). Ésta estructura hace más estable el extremo positivo y bajo estas condiciones el microtúbulo crecerá en longitud (Rezania et al., 2008).

La velocidad de polimerización, sin embargo, depende de las condiciones del entorno citosólico en las que se encuentre el extremo positivo del microtúbulo en crecimiento. Si la velocidad de polimerización se ralentiza, la velocidad de hidrólisis de GTP alcanza y supera a la de polimerización. Ello implica que llegará un momento en el que en el extremo positivo no habrá dímeros de tubulina-GTP, sino dímeros de tubulina-GDP, los cuales tienen una interacción inestable entre ellos cuando se encuentran formando parte del extremo del microtúbulo. Este hecho provoca una despolimerización masiva y la liberación de los dímeros de tubulina-GDP (Chrétien et al., 1999; Panda et al., 2002). Los dímeros de tubulina-GDP que quedan libres son convertidos rápidamente en dímeros de tubulina-GTP y por tanto pueden volver a unirse al extremo positivo de otro microtúbulo en crecimiento (Figura 7).



**Figura 7.** Inestabilidad dinámica de los microtúbulos. **1:** La polimerización empieza con la incorporación de nuevos dímeros de tubulina. La hidrólisis de GTP cambia la conformación de los protofilamentos de una estructura ligeramente curvada de GTP-tubulina a una más fuertemente curvada de GDP-tubulina. **2:** El cierre del extremo de los microtúbulos genera un microtúbulo en estadio intermedio que puede mantenerse en pausa, antes de someterse a un mayor crecimiento (rescate) o pasar a la fase de despolimerización (catástrofe). **3:** Una disminución de los microtúbulos se caracteriza por una estructura de protofilamentos a forma de fuente. **4:** El ciclo de polimerización-despolimerización se completa mediante el intercambio de los productos de desensamblaje GDP con GTP. (Modificado de Dràber et al., 2012).

El segundo comportamiento dinámico que caracteriza a los microtúbulos, denominado “*treadmilling*” (flujo de subunidades), es el crecimiento neto en un extremo y el decrecimiento neto en el opuesto (Margolis and Wilson, 1978; Margolis and Wilson, 1998; Rodionov and Borisy, 1997; Shaw et al., 2003), e implica un flujo de heterodímeros de tubulina desde el extremo negativo al positivo. Este tipo de comportamiento adquiere particular importancia durante la metafase y la anafase de la mitosis (McIntosh et al., 2002) (Figura 8).



**Figura 8. Treadmilling.** Los microtúbulos sufren desplazamiento neto a través de la pérdida lenta y constante de las subunidades del extremo negativo y la adición de otras en el extremo positivo. La barra de marcaje muestra que los microtúbulos permanecen en la misma posición, mostrando que el movimiento hacia el extremo positivo es debido al flujo de subunidades de tubulina a través del polímero. (Modificado de Lloyd and Chan, 2004).

A pesar de ser muy diferentes, los dos comportamientos dinámicos descritos no son mutuamente exclusivos y una población específica de microtúbulos puede mostrar inestabilidad dinámica, *treadmilling* o una mezcla de los dos. De todas formas, los mecanismos que llevan a uno u otro se desconocen, si bien posiblemente impliquen el grado de modificaciones post-traduccionales de la tubulina, la acción de ciertas proteínas reguladoras y la composición de isotipos de tubulina del microtúbulo (Arai et al., 2002; Lewis et al., 1985; McKean et al., 2001; Nicoletti et al., 2001; Pape et al., 2002; Villasante et al., 1986; Wilson et al., 1999; Rezania et al., 2008).

En los seres humanos, hay seis isotipos de  $\alpha$ -tubulina y siete de  $\beta$ -tubulina (Panda et al., 1994; Lu and Luduena, 1994), y el nivel de expresión de cada isotipo varía en diferentes tejidos y células. Cada isotipo puede ser dividido en subtipos diferentes de acuerdo con la modificación postraducciona, incluyendo la fosforilación, poliglutamilación, poliglicilación, acetilación, detirosinación/tirosinación, o incluso la eliminación del penúltimo residuo de glutamato en la  $\alpha$ -tubulina (Orr et al., 2003; Mollinedo and Gajate, 2003).

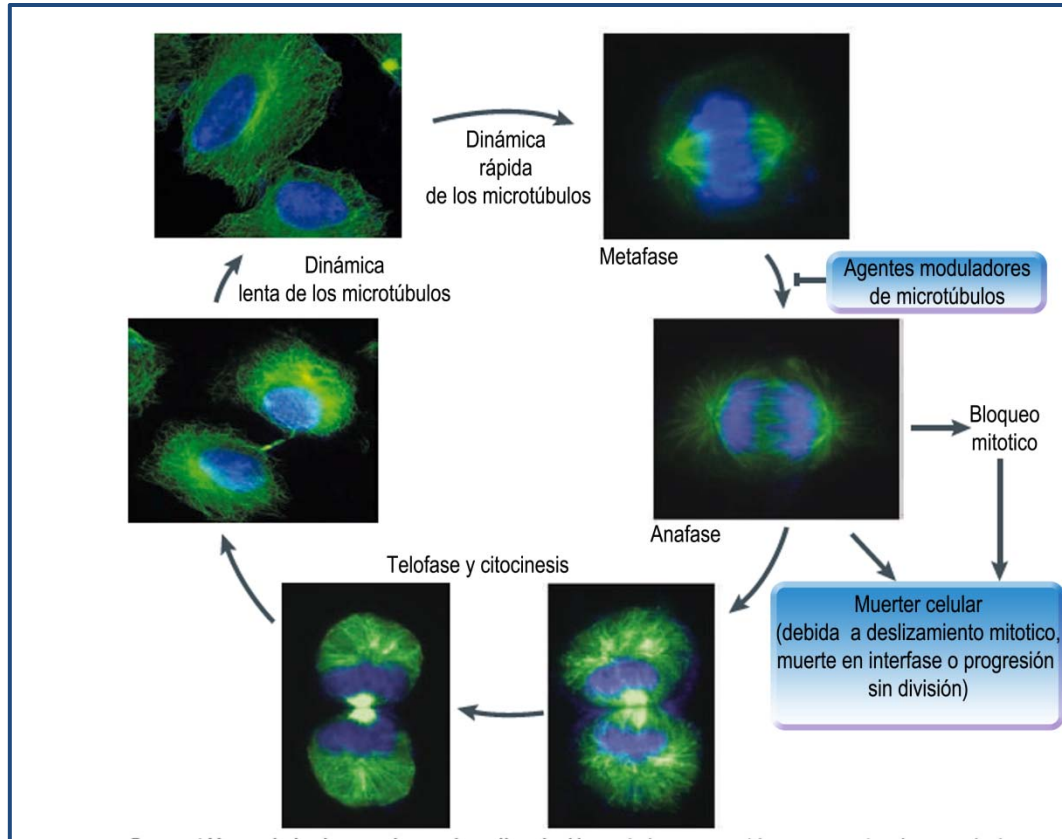
Aunque los microtúbulos se puedan ensamblar *in vitro* a partir de altas concentraciones de subunidades de tubulina purificadas, *in vivo* la concentración de dímeros de tubulina en el citosol no es suficiente per se para la formación espontánea de microtúbulos. Por ello existen los denominados MTOCs (centros organizadores de microtúbulos) (Gould and Borisy, 1977; Brinkley, 1985), lugares donde comienza la polimerización de un nuevo microtúbulo y donde suelen estar anclados sus extremos negativos. El principal MTOC en las células animales es el *centrosoma*, el cual controla el número, localización y orientación de estos polímeros en el citoplasma. Durante la formación del huso mitótico los extremos negativos se concentran en los polos del huso y los positivos se dirigen hacia su ecuador, lugar donde se alinearán los cromosomas antes de separarse (Honore et al., 2005; Jordan and Wilson, 2004).

Las propiedades dinámicas de los microtúbulos son de vital importancia para llevar a cabo correctamente las diversas funciones celulares de las que son responsables (Rezania et al., 2008). Estas estructuras juegan un papel crucial en el desarrollo y mantenimiento de la forma celular, en el transporte de vesículas, mitocondrias y otros componentes de las células, en la señalización celular y en la división, especialmente en el proceso de formación del huso mitótico durante la mitosis (Walczak et al., 2010).

Los microtúbulos del huso mitótico son entre diez y cien veces más dinámicos que los interfásicos, característica requerida durante todas las fases de la mitosis (Hayden et al., 1990; Rusan et al., 2001; Zhai et al., 1996). Esta es una condición fundamental en primer lugar para el anclaje correcto de los cromosomas al huso tras la ruptura de la membrana nuclear durante la prometafase (Hayden et al., 1990), asimismo para los movimientos complejos que los alinean en la placa metafásica y por último para su separación sincronizada durante la anafase y telofase una vez que se ha completado correctamente el punto de comprobación metafase-anafase (Jordan and Wilson, 2004). Una alteración en la dinámica de los microtúbulos afecta a todas estas funciones, impidiendo que se lleven a cabo correctamente. Como consecuencia, se bloquea la progresión normal del ciclo (Jordan et al., 1993),



provocando que la célula salga de mitosis de manera aberrante y entre en apoptosis (Jordan et al., 1996) (Figura 9).



**Figura 9.** Cambios de los microtúbulos durante el ciclo celular. Las estructuras de los microtúbulos (en verde) están sometidas a cambios morfológicos para mediar funciones específicas a lo largo del ciclo celular. La dinámica de los microtúbulos puede variar durante el ciclo celular, siendo menos dinámico en las células en interfase y más durante la mitosis (Rusan et al., 2001; Zhai et al., 1996). El ADN se muestra en azul. (Modificado de Kavallaris, 2010).

Debido a su carácter indispensable en la mitosis y la división celular, lo que evita la activación de caminos alternativos para el mismo proceso, los microtúbulos personifican las mejores dianas contra el cáncer identificadas hasta ahora (Dumontet and Jordan, 2010). Así, modificaciones en los mecanismos biológicos controlados por tubulina o por actina tienen gran implicación en la patología del cáncer. Por tanto, una de las opciones más efectivas para el tratamiento farmacológico de los tumores está seguramente



representada por la búsqueda de moduladores de estos dos componentes fundamentales del citoesqueleto.

### **3. Compuestos con potencial uso farmacéutico dirigidos contra microtúbulos y microfilamentos.**

Los productos naturales, bien puros o bien como extractos crudos, han conformado la base de la medicina popular desde los albores de la humanidad y, naturalmente, también de la medicina con base científica en épocas más recientes (Dewick, 2002). Varios de los más grandes científicos en el campo de la química orgánica sintética han labrado buena parte de su prestigio a través de las síntesis totales de productos naturales, incluyendo los más complejos desde el punto de vista estructural (Corey and Cheng, 1989; Nicolaou and Sorensen, 1996; Nicolaou and Snyder, 2003). Se ha afirmado con buen criterio que *“la síntesis total de productos naturales ha servido...para el descubrimiento de nueva reactividad química, la evaluación de teorías en química física orgánica...e impulsar la biología y la medicina”* (Nicolaou and Snyder, 2004).

Es evidente que estos aspectos constituyen por sí mismos una buena justificación para afrontar la síntesis de un producto natural (Hanessian, 2006). Conviene hacer hincapié además en que los productos naturales no han sido útiles solamente por sus propiedades medicamentosas, sino también porque, para el desarrollo y diseño de nuevos productos o bien para modificar las estructuras de aquéllos y así eliminar efectos colaterales no deseados (Castro et al., 2006; Makins and Ballinger, 2003; Tafazoli and O'Brien, 2005), se han obtenido compuestos con propiedades farmacológicas mejoradas.

Los fármacos de unión a microtúbulos y a microfilamentos no son una excepción al hecho mencionado, habiéndose descubierto muchos de ellos entre los productos de la naturaleza. Aunque varios de los principales agentes antimitóticos descritos en las últimas décadas han mostrado que deben su actividad a su capacidad de interaccionar con los microtúbulos del citoesqueleto, interfiriendo en su dinámica de polimerización, inhibiendo la proliferación celular y, por tanto, bloqueando la mitosis; ningún agente dirigido

contra los microfilamentos ha sido analizado todavía para ensayos de este tipo (Trigili et al., 2011).

La idea de investigar productos activos frente a dianas proteínicas ha representado la idea central del presente trabajo: la concepción y el análisis de estructuras orgánicas no naturales pero emparentadas estructuralmente con las mismas que muestren interacciones relevantes con proteínas clave del organismo humano, y cuya alteración en el funcionamiento se refleje en algún tipo de patología importante como es el cáncer.

Basándonos en estos criterios, se han elegido unas dianas biológicas tan relevantes como tubulina y actina.

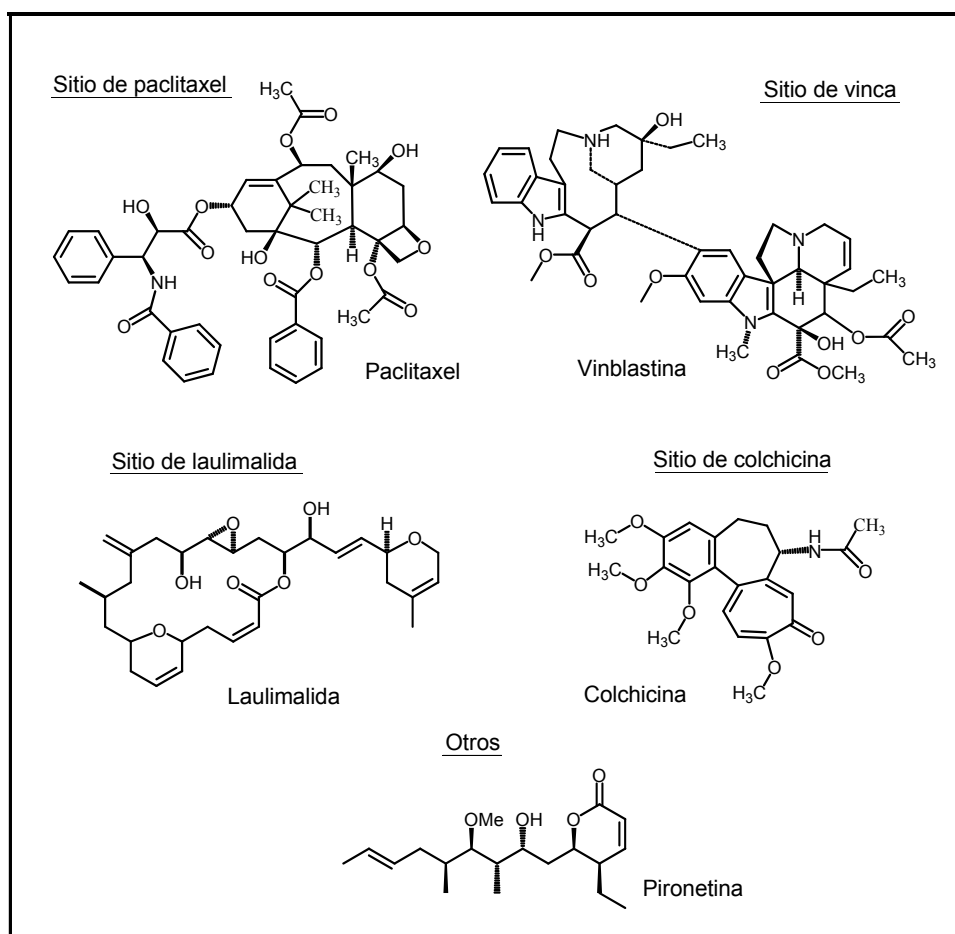
### **3.1. Agentes antimitóticos dirigidos contra tubulina.**

El descubrimiento y el desarrollo primario de los fármacos de unión a microtúbulos se remonta unos 50 años atrás (Noble et al., 1958), cuando los alcaloides de la vinca fueron aislados de las hojas de una flor de Madagascar (*Catharanthus roseus*).

Convencionalmente, los compuestos antimitóticos dirigidos contra los microtúbulos se clasifican en dos grupos: estabilizantes y desestabilizantes (Morris and Fornier, 2008; Dumontet and Jordan, 2012). A elevadas concentraciones, el primer grupo promueve la polimerización de los microtúbulos (Díaz and Andreu, 1993), estabiliza y aumenta la masa del polímero; mientras que el segundo inhibe su polimerización (Altmann and Gertsch, 2007; Singh et al., 2008), los desestabiliza y disminuye su masa. Sin embargo, cada vez se valora más que todos estos medicamentos atenúen la dinámica de los microtúbulos a concentraciones nanomolares sin alterar la masa neta (Jordan and Wilson, 2004; Panda et al., 1996; Yvon et al., 1999). En otras palabras, los efectos de estos compuestos sobre la dinámica de microtúbulos son más poderosos que los producidos sobre la masa total de los mismos. Esta última circunstancia representa el mecanismo de acción que más comúnmente tiene lugar en clínica (Hudes et al., 1992; Infante et al., 2009; William et al., 2010). En todo caso, los efectos específicos de cada uno de estos compuestos sobre la masa, estabilidad y dinámica de los microtúbulos

son bastante complejos y varían de uno a otro. Por lo tanto y dado que ocupan sitios diferentes en su diana celular se han clasificado en base a sus sitios de unión además de por su forma de actuar (Figura 10).

La mayoría de los compuestos antimitóticos conocidos están dirigidos contra tres sitios de unión muy bien caracterizados en  $\beta$ -tubulina (Jordan and Wilson, 2004; Zhou and Giannakakou, 2005): el sitio del paclitaxel, el dominio de vinca y el sitio de la colchicina. Además, se ha demostrado la existencia de al menos otros dos sitios a nivel de la molécula de tubulina: el primero a nivel del residuo Lys352 del segmento de  $\alpha$ -tubulina (Usui et al., 2004a) y un segundo (sitio de laulimalida) cuya localización está todavía bajo estudio (Bennett et al., 2010; Huzil et al., 2008; Jiménez-Barbero et al., 2006; Kanakkanthara et al., 2011; Pera et al., 2010; Pineda et al., 2004).



**Figura 10.** Estructuras químicas de algunos agentes moduladores de la dinámica de microtúbulos, clasificados según su sitio de unión en la tubulina.

Finalmente, es importante mencionar que estudios preclínicos y clínicos recientes han demostrado que los fármacos dirigidos contra los microtúbulos pueden tener también acciones antiangiogénicas terapéuticamente relevantes (Pasquier et al., 2006; Schwartz, 2009). Aunque los mecanismos celulares y moleculares de estos efectos no se entienden completamente, algunas de dichas acciones antivasculares se deben en parte a los efectos directos sobre las células endoteliales. Muchos de estos compuestos (tanto estabilizantes como desestabilizantes) han demostrado inhibir la proliferación y migración de las células endoteliales, fundamentales para la formación de nuevos vasos sanguíneos (Zhou and Giannakakou, 2005; Lippert, 2007; Dumontet and Jordan, 2010). De este modo, un tumor al que se le impida su vascularización no tendrá aporte de nutrientes y por tanto no progresará y sus células terminarán muriendo.

### **3.1.1. Promotores del ensamblaje de microtúbulos: medicamentos estabilizantes.**

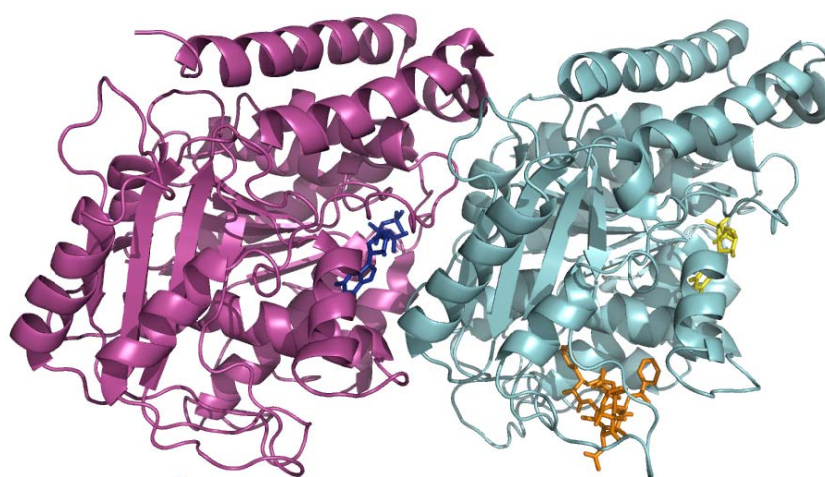
Hasta hace poco tiempo los únicos estabilizantes de microtúbulos conocidos fueron los taxanos y los fármacos que se unen o a su sitio en  $\beta$ -tubulina incluyendo paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®, análogo semisintético del paclitaxel) y epotilonas; o a otro sitio distinto conocido como sitio de laulimalida, cuya localización en la tubulina no se ha definido y al que se unen laulimalida y pelorusido A (Buey et al., 2005).

#### **3.1.1.1. Ligandos del sitio del paclitaxel.**

El paclitaxel fue el primer compuesto estabilizador de microtúbulos que se descubrió. Originalmente aislado de la corteza del árbol del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) en la década de 1960, se hubo de esperar hasta 1980 para conocer su mecanismo de acción (Schiff et al., 1979). En 1995 se aprobó su uso clínico, representando el pilar del tratamiento para varios tumores sólidos, incluyendo neoplasias de mama, ovario, pulmón y sarcoma de Kaposi (Jordan and Wilson, 2004; Montero et al., 2005; Gridelli et al., 2005; Markman, 2008).

El paclitaxel facilita el ensamblaje de tubulina bajo todas las condiciones de reacción, que incluyen bajas concentraciones de tubulina, menor temperatura que la requerida para el ensamblaje, ausencia de proteínas reguladoras (MAPs, *Microtubule Associated Proteins*) y ausencia de GTP (Orr et al., 2003); resultando en polímeros de tubulina altamente resistentes (Hamel et al., 1981; Kumar, 1981; Thompson et al., 1981). Estos hechos ponen además de relieve que el paclitaxel aumenta la nucleación y la elongación de los microtúbulos.

En 1998, Eva Nogales publicó la localización del sitio de unión del paclitaxel en la cara luminal de la subunidad  $\beta$  del heterodímero de tubulina (Nogales et al., 1998) (Figura 11). Sin embargo, datos de cinética de unión del compuesto a microtúbulos obtenidos simultáneamente por nuestro laboratorio, mostraron una interacción muy rápida entre ambos, y por tanto incompatible con el acceso del paclitaxel a su sitio luminal por simple difusión. Como consecuencia, se especuló entonces con la existencia de un sitio intermedio de unión cercano al poro tipo I en la superficie del microtúbulo, al que la molécula se uniría inicialmente para luego ser internalizada al sitio luminal (Díaz et al., 2003). Dicha hipótesis se confirmó cuatro años más tarde gracias al estudio de la unión covalente del ligando de origen bacteriano ciclostreptina (Sato et al., 2000), que se unía a los aminoácidos de la subunidad  $\beta$  Thr220 y Asn228. El primer sitio estaría localizado en la cara externa del microtúbulo, cerca del sitio externo propuesto previamente, y el segundo en el sitio luminal del paclitaxel descrito por Eva Nogales años atrás (Buey et al., 2007). Posteriormente, se profundizó en la caracterización de dicho sitio externo denominado sitio del poro I (Barasoain et al., 2010; Canales et al., 2011; Magnani et al., 2009), de modo que con tales evidencias no se discute hoy en día su existencia.



**Figura 11.** Estructura del sitio de unión del paclitaxel. Diagrama de cintas del sitio de unión del paclitaxel (naranja) en la cara luminal de la subunidad  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  se representa en morado, la  $\beta$  en azul claro, el GTP en azul marino y el GDP en amarillo. Archivo 1JFF del Protein Data Bank (PDB).

A pesar del uso clínico satisfactorio del paclitaxel y de su análogo docetaxel, estos compuestos tienen varias desventajas que limitan su aplicabilidad, tales como la baja solubilidad acuosa y el desarrollo de resistencias de las células tumorales (Orr et al., 2003). Para abordar este problema, en los últimos años se ha propuesto buscar características que permitan diseñar ligandos que carezcan de dichos inconvenientes y que, por su modo de interacción, sean igualmente activos.

#### **3.1.1.1.1. Discodermolida y dictioistatina.**

El éxito del paclitaxel ha demostrado una vez más el poder de la naturaleza en términos de descubrimiento de moléculas biológicamente activas como cura para las enfermedades. La búsqueda de nuevos compuestos con un mecanismo de acción similar al del paclitaxel, pero con una mayor solubilidad acuosa y eficacia, en particular ante células resistentes a este agente, ha conducido al aislamiento de nuevos productos naturales (He et al., 2001).

Después del paclitaxel, otros productos naturales han demostrado ser capaces de unirse y estabilizar los microtúbulos. A raíz del desarrollo de estos

prometedores compuestos antimitóticos, en la década de 1990, se comenzó la búsqueda y el descubrimiento de otros agentes de origen marino.

La discodermolida, originariamente aislada de una esponja marina del Caribe, *Discodermia dissoluta*, fue aislada y caracterizada por primera vez por Gunasekera y sus colaboradores (Gunasekera et al., 1989; Gunasekera et al., 1990). Más tarde se determinó su estructura primaria, mediante extensos estudios espectroscópicos, y su estereoquímica relativa, mediante cristalografía de rayos X (Gunasekera et al., 1990). La configuración absoluta, sin embargo, permaneció indefinida hasta el estudio del grupo de Schreiber (Neremberg et al., 1993), mientras que la estructura en solución fue determinada *a posteriori* por los grupos de Smith (Smith et al., 2001) y Synder (Monteagudo et al., 2001).

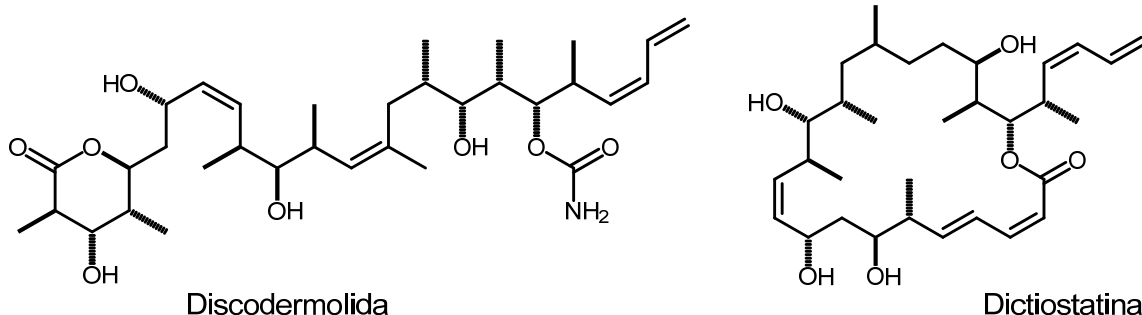
Las primeras investigaciones de las propiedades biológicas de este compuesto se centraron en su acción como potente inmunosupresor, tanto *in vivo* como *in vitro* (Longley et al., 1991a-b). En 1994, el grupo de Schreiber (Hung et al., 1994) mostró distintas propiedades celulares y de unión de la discodermolida sintetizada. En 1996, un *screening* biológico puso de manifiesto que este compuesto destruía las células tumorales a través de la inducción de la polimerización de tubulina y la sucesiva estabilización de los microtúbulos (ter Haar et al., 1996). Se comprobó su espectacular potencia en la inducción de haces de microtúbulos en células, además de inhibir fuertemente la unión del paclitaxel a su sitio en los microtúbulos (Kowalski et al., 1997). Asimismo, este compuesto mostró una potente actividad antiproliferativa contra un amplio rango de líneas celulares tumorales y una capacidad inhibitoria del crecimiento de tumores sólidos fármaco-resistentes a concentraciones nanomolares. De este modo, la discodermolida mostró un mecanismo de estabilización de los microtúbulos parecido al del primer agente estabilizante descubierto, y sobre todo una mayor afinidad de unión a la tubulina. Además manifestó una relación sinérgica con el mismo paclitaxel (Honore et al., 2004; Martello et al., 2000), probablemente debido al hecho que el compuesto de origen marino no se une a los mismos residuos peptídicos dentro del sitio de paclitaxel (Khrapunovich-

Baine et al., 2009), hecho que favorecería su potencial uso en terapia de combinación.

Los excelentes resultados referenciados culminaron en la síntesis de una gran cantidad de compuesto natural para su uso en ensayos de fase clínica I. La discodermolida fue licenciada por *Novartis Pharmaceutical Corporation* (Basilea, Suiza) en 1998 para el desarrollo como fármaco anticancerígeno. Desafortunadamente, no superó las fases clínicas de desarrollo debido a su elevada toxicidad (Dumontet and Jordan, 2010).

La dictiostatina es una macrolactona de origen marino, que se aisló por primera vez en pequeñas cantidades a partir de la esponja marina del género *Spongia sp.* en la Republica de las Maldivas por Pettit y sus colaboradores (Pettit et al., 1994) y más recientemente por Wright y colaboradores de la esponja *Lithistida* en el mar de Caribe (Isbrucker et al., 2003). Su estructura química es muy similar a la de la discodermolida, pero mientras la dictiostatina es un ciclo la discodermolida es una molécula lineal (Figura 12).

La dictiostatina fue identificada como un potente agente estabilizante de microtúbulos que, como la discodermolida, se une al mismo sitio mostrando una citotoxicidad todavía más elevada en líneas tumorales fármaco-resistentes (Isbrucker et al., 2003; Madiraju et al., 2005).



**Figura 12.** Estructuras químicas de discodermolida y dictiostatina.



### 3.1.1.2. Laulimalida y pelorusido A.

Durante mucho tiempo después del hallazgo del paclitaxel se pensó que todos los agentes estabilizadores de microtúbulos unían al mismo sitio en el heterodímero de tubulina. Sin embargo, fruto de una investigación en la que formó parte nuestro laboratorio se descubrió que al menos uno de ellos, la laulimalida, se unía a un sitio distinto (Pryor et al., 2002).

La laulimalida es un agente estabilizador de microtúbulos aislado inicialmente de extractos crudos de la esponja *Cacospongia mycofijiensis* colectada en Vanuatu (Quiñoá et al., 1988) e independientemente en esponjas de Indonesia (Corley et al., 1988) y de Okinawa (Jefford et al., 1996).

Algunos años más tarde, Northcote y sus colaboradores aislaron de extractos de esponjas *Mycale hentscheli*, recolectadas en la isla norte de Nueva Zelanda, el agente estabilizador de microtúbulos pelorusido A (West et al., 2000). Se comprobó cómo este nuevo compuesto se unía al mismo sitio de la laulimalida, o al menos solapaba parcialmente con él (Gaitanos et al., 2004). Ambos compuestos mantienen su actividad en líneas celulares tumorales resistentes a fármacos (Mooberry et al., 1999; Gaitanos et al., 2004), hecho que les ha convertido en atractivos candidatos a fármacos antitumorales.

La localización del sitio de unión de ambos compuestos en la tubulina aún no se ha definido. En un inicio se creyó que se encontraba en la subunidad  $\alpha$ , según sugerían diversos datos de estudios bioquímicos, de modelado molecular y de resonancia magnética nuclear (RMN) (Pineda et al., 2004; Jiménez-Barbero et al., 2006; Pera et al., 2010). Sin embargo, cada vez se va estableciendo con más importancia la hipótesis de que está localizado en la subunidad  $\beta$ , acorde con los datos de estudios de intercambio hidrógeno-deuterio (Huzil et al., 2008; Bennett et al., 2010) y celulares (Kanakkanthara et al., 2011). Resultados recientes de nuestro grupo, y no publicados, lo han confirmado.

### **3.1.2. Inhibidores del ensamblaje de microtúbulos: medicamentos desestabilizantes.**

Otro grupo importante de medicamentos antimitóticos incluye aquellos agentes que se unen al dominio de vinca o al sitio de colchicina en la tubulina y actúan desestabilizando la estructura de los microtúbulos a altas concentraciones. Sin embargo, como los fármacos polimerizantes, generalmente se suministran a concentraciones mucho más bajas clínicamente, y actúan mediante la interrupción dinámica de los microtúbulos frente a la simple reducción de la polimerización. Esta circunstancia bloquea las células en mitosis, llevando eventualmente a apoptosis (Jordan and Wilson, 2004).

#### **3.1.2.1. Sitio de unión en $\beta$ -tubulina.**

##### **3.1.2.1.1. Ligandos del dominio de vinca.**

Esencialmente, el dominio de la vinca es una diana para todos aquellos agentes que interfieren con la unión de vinblastina, un alcaloide de la vinca, sobre la tubulina. Dentro del enorme grupo de agentes desestabilizantes de microtúbulos, que también incluyen los compuestos que se unen al sitio de colchicina (Orr et al., 2003), los alcaloides de la vinca están siendo empleados con éxito en clínica en la quimioterapia contra el cáncer (Yue et al., 2010).

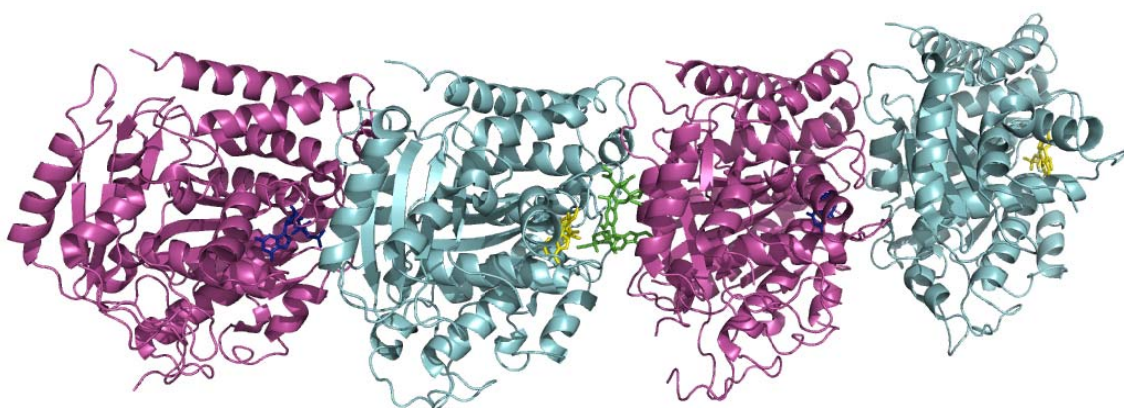
Los alcaloides de la vinca, una clase de compuestos antimitóticos derivados de la planta de la vinca, *Catharanthus roseus* (Cutts et al., 1960), actúan mediante la unión a la subunidad  $\beta$  de la tubulina cerca del sitio de unión de GTP (Rai and Wolff, 1996) y detienen la mitosis en prometáfase (Jordan et al., 1998; Checchi et al., 2003; Correia and Lobert, 2001).

A los dos compuestos naturales aislados originalmente, vinblastina (Velban®) y vincristina (Oncovin®), aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) en 1961 y 1963 respectivamente, se les sumaron algunos derivados semisintéticos, entre los que destacan la vinorelbina (Lobert et al., 1996), vindesina, vinflunina (Duflos et al., 2002), halicondrinas (Bai et al., 1991), hemiasterlinas (Anderson et al., 1997; Bai et al., 1999), espongistatina (Bai et al., 1993), dolastinas (Bai et al., 1990) y criptoficinas (Kerksiek et al., 1995). Cada uno se encuentra en distintas fases de desarrollo clínico para su

utilización como agentes quimioterapéuticos en la lucha contra el cáncer (Duflos et al., 2002; Hamel, 1992).

Estos agentes se unen tanto a tubulina no polimerizada como a microtúbulos, y sus acciones son dependientes de la concentración. A concentraciones muy altas (del orden de  $\mu\text{M}$ ) inducen a la tubulina a formar polímeros espirales y estructuras paracristalinas (Haskins et al., 1981; Jordan et al., 1986). A concentraciones relativamente altas (10-100 nM) causan la despolimerización de los microtúbulos y deshacen el huso mitótico, bloqueando las células en mitosis (Jordan et al., 1991; Dumontet and Jordan, 2010). Sin embargo, a concentraciones más bajas suprimen la dinámica de los microtúbulos sin despolimerizar el huso mitótico, aunque siguen siendo capaces de bloquear las células en mitosis e inducir apoptosis (Jordan et al., 1991; Toso et al., 1993).

La estructura de alta resolución del sitio de unión de los alcaloides de la vinca en el dímero de tubulina ha sido descrita por cristalografía de rayos X (Gigant et al., 2005). En esta estructura, la vinblastina se introduce como una cuña entre dos dímeros de tubulina, interaccionando con la subunidad  $\alpha$  de uno y la  $\beta$  del otro (Figura 13).



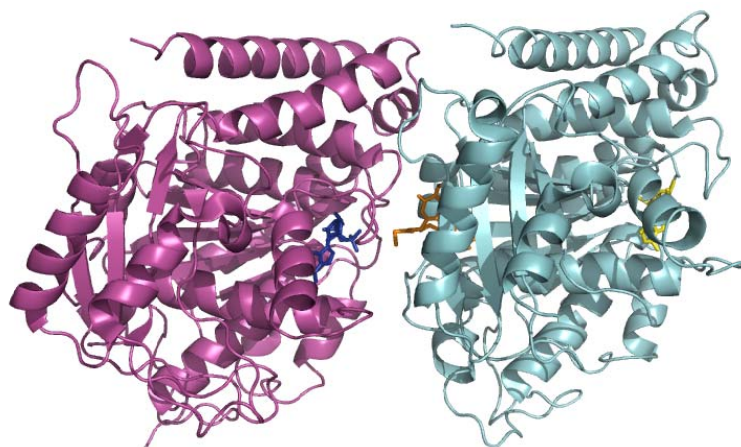
**Figura 13.** Estructura del dominio de vinca. Diagrama de cintas del sitio de unión de la vinblastina (verde) en la región entre heterodímeros de tubulina. La subunidad  $\alpha$  se representa en morado, la  $\beta$  en azul claro, el GTP en azul oscuro y el GDP en amarillo. Archivo 1Z2B del Protein Data Bank (PDB).

### **3.1.2.1.2. Ligandos del dominio de colchicina.**

La colchicina es un compuesto, aislado del azafrán silvestre *Colchicum autumnale* en 1820 (Pelletier and Caventon, 1820), que destruye el huso mitótico. La tubulina se describió por primera vez como la proteína de unión a este compuesto en células (Borisy and Taylor, 1967a).

La colchicina se usa para el tratamiento de la gota, pero su utilización como antitumoral no ha tenido ningún éxito probablemente debido a su gran citotoxicidad en tejidos sanos (Zhou and Giannakakou, 2005; Weisenberg et al., 1968; Borisy and Taylor, 1967a-b). Sin embargo, otras drogas que se unen al mismo sitio que ella han cobrado interés en su desarrollo como potenciales agentes quimioterapéuticos. Entre estos destacan las combrestatinas (Hamel and Lin, 1983), el 2-metoxi-estradiol (metabolito natural del estradiol) (Mabjeesh et al., 2003) y la podofilotoxina (Kinghorn et al., 1993). De forma similar a lo que ocurre con los alcaloides de la vinca, los ligandos que se unen al sitio de colchicina producen la despolimerización de los microtúbulos a elevadas concentraciones y suprimen la dinámica de los microtúbulos a concentraciones más bajas (Skoufias and Wilson, 1992).

El sitio de unión a la colchicina se encuentra en el centro del dímero de tubulina, a la derecha de la interfaz de los monómeros de  $\alpha$  y  $\beta$  tubulina (Figura 14). Se encuentra en el lumen del filamento en lugar de estar interactuando en la superficie. La unión al sitio de la colchicina es seguido por un cambio conformacional que implica una flexión intradímeros, donde los monómeros de tubulina sufren un giro en torno a la interfaz. Este cambio permite la inclusión del complejo colchicina-tubulina en el interior de los filamentos de los microtúbulos (Downing and Nogales, 1998, 1999; Garland, 1978), produciendo una estabilización del dímero de tubulina que no permite el establecimiento de los contactos laterales necesarios para formar el microtúbulo (Ravelli et al., 2004).



**Figura 14.** Estructura del sitio de unión de la colchicina. Diagrama de cintas del sitio de unión de la colchicina (naranja) en la región entre monómeros del heterodímero de tubulina. La subunidad  $\alpha$  se representa en morado, la  $\beta$  en azul claro, el GTP en azul marino y el GDP en amarillo. Archivo 1Z2B del Protein Data Bank (PDB).

#### 3.1.2.1.2.1. Podofilotoxina.

El podófilo toma su nombre de las palabras griegas *podos* y *phylon*, que significan hojas en forma de pie. Los rizomas de podófilo tienen una historia medicinal extensa en las tribus nativas norteamericanas, que usaban un polvo de rizoma como laxante o como antihelmíntico (erradicador de lombrices parasitas) y emplastos de polvo para tratar verrugas y crecimientos tumorosos de la piel.

La podofilotoxina (Kelly and Hartwell, 1954) representa el mayor y más abundante ciclolignano presente en la naturaleza, principalmente aislado de la planta que se usa para producir también drogas citostáticas semisintéticas tales como etoposide y teniposide.

La sustancia se obtuvo por primera vez de la manzana de mayo americana (*Podophyllum peltatum*) y más tarde de la manzana de mayo himalaya (*Podophyllum hexandrum* o *Podophyllum emodi*) (Kelly and Hartwell, 1954; Imbert, 1998). El compuesto presentó propiedades catárticas, antirreumáticas y antivirales, aunque su actividad antimitótica demostró ser la más atractiva para los investigadores (Bohlin and Rosen, 1996).

La podofilotoxina es conocida como un agente antimicrotubular que se une al sitio de la colchicina (Jordan et al., 1998), pero debido a su severa

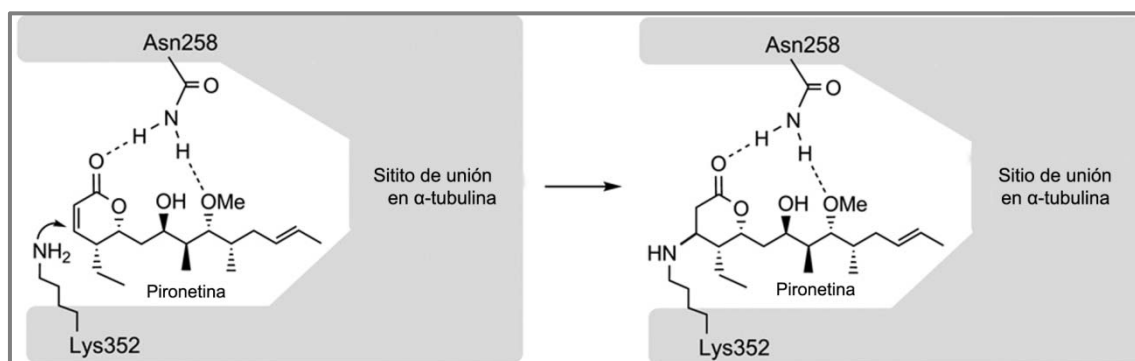
toxicidad no está siendo utilizado como medicamento contra el cáncer. Sin embargo, se están empleando dos derivados semisintéticos (etoposide y teniposide) como drogas contra varios tipos de cáncer, incluyendo carcinoma testicular, linfoma y sarcoma de Kaposi (Jardine et al., 1980; Issell, 1982; Lee et al., 1990; Stahelin and von Wartburg, 1989; Wang et al., 1990).

### 3.1.2.2. Sitio de unión en $\alpha$ -tubulina.

Como se ha mencionado previamente, en la literatura hay descritos una buena cantidad de productos que exhiben capacidad de despolimerización de los microtúbulos. Si bien pertenecen a tipos estructurales muy diferentes, casi todos estos compuestos se caracterizan por interactuar específicamente con la  $\beta$ -tubulina, aunque en distintos sitios.

Por otro lado, el grupo de sustancias que se unen de manera específica a la  $\alpha$ -tubulina es muy reducido al menos en los ejemplos conocidos hasta ahora, dando siempre como resultado la disrupción de los microtúbulos.

La  $\alpha$ -pirona de origen natural, pironetina, es uno de estos pocos ejemplos y el primero en ser descrito. Se sabe que el compuesto se une covalentemente al residuo Lys352 del segmento de  $\alpha$ -tubulina situado en la entrada de un pequeño hueco en el mismo y frente al segmento de  $\beta$ -tubulina del dímero siguiente (Usui et al., 2004a) (Figura 15).



**Figura 15.** Modelo esquemático de la unión covalente de pironetina a su sitio en  $\alpha$ -tubulina. (Modificado de Marco et al., 2011).

### 3.1.2.2.1. Pironetina.

La pironetina fue aislada casi a la vez en dos microorganismos diferentes del género *Streptomyces*: en uno de ellos como producto regulador del crecimiento vegetal (Kobayashi et al., 1994a-b) y en el otro como producto con capacidad inmunosupresora, dándosele en este último caso la denominación PA-48153C (Yasui et al., 1995).

Existen ya ciertos estudios de relación estructura-actividad en el caso de la pironetina, si bien de naturaleza limitada (Kondoh et al., 1998; Kondoh et al., 1999; Watanabe et al., 2000; Usui et al., 2004a). Se prepararon una pequeña serie de derivados de dicha molécula, llegándose a establecer con ellos que la presencia del doble enlace conjugado entre C2-C3 era esencial para la actividad. Este hecho se atribuyó a la capacidad de este enlace como aceptor Michael (Usui et al., 2004a; Watanabe et al., 2000) que se une covalentemente al antes mencionado residuo Lys352 de la tubulina. Otros estudios (Usui et al., 2004a) también establecieron la importancia de la presencia de otras partes estructurales de la molécula, como por ejemplo el oxígeno unido al C9, sin importar que estuviera metilado o libre, y el hidroxilo libre en C7 (Watanabe et al., 2000). También se ha postulado que un determinado residuo de asparagina (Asn258) de la  $\alpha$ -tubulina contribuye a mantener fija la molécula de pironetina en el punto de unión gracias a dos puentes de hidrógeno entre dicho residuo y dos átomos de oxígeno del producto (el carbonílico y el unido al C9). Esta conclusión se basó en el hecho que tubulinas mutadas en las que dicho aminoácido estaba remplazado por otro incapaz de formar dichos puentes de hidrógeno no mostraban ninguna reactividad por la pironetina (Usui et al., 2004a). Sin embargo, no hay datos disponibles relativos a la importancia de las otras partes de la molécula.

Un estudio reciente estableció la utilidad de la pironetina en la terapia antitumoral para vencer la resistencia a medicamentos en ciertos tipos de líneas tumorales. Por ejemplo, se evidenció su capacidad antiproliferativa en el caso de células humanas de carcinoma de pulmón H69 que exhibían resistencia frente a la vindesina y al paclitaxel (dos productos que interaccionan ambos con la  $\beta$ -tubulina). Asimismo, el compuesto demostró ser capaz de

### 3.2. Agentes antimetabólicos dirigidos contra actina.

Las amfidinolidas representan un grupo de macrólidos citotóxicos estructuralmente distintos, aislados de algunos dinoflagelados simbióticos del género *Amphidinium* sp. del tejido interno de una alga de los arrecifes del coral de Okinawa (Usui, 2007; Kobayashi et al., 2000).

C[C@H](O)[C@@H](OC(=O)C=C[C@H]1CC[C@H](CO)C[C@H](O)C(=O)CC[C@H](C)=CC[C@H](C)C1O)C=C

79



La amfidinolidas H tiene como diana biológica la actina, deformando drástica e irreversiblemente los filamentos de la misma (Usui et al., 2004b). Como consecuencia de la destrucción del elevado nivel de organización de la actina, se observan algunos agregados desorganizados y células multinucleadas (células poliploides). Ensayos realizados *in vitro* utilizando la actina purificada indicaron que el compuesto podía estimular su polimerización de manera tiempo-dependiente y estabilizar los polímeros ya formados (F-actina) (Oda et al., 2005; Saito et al., 2004).

Como consecuencia de estos resultados, se especuló con la posibilidad de estudiar el mecanismo de acción de las amfidinolidas estructuralmente similares, incluso moléculas más pequeñas, ya que podrían presentar las mismas características, como provocar el bloqueo de células tumorales en mitosis y tener como diana los filamentos de actina constituyendo, por ello, un conjunto de buenos agentes anticancerígenos (Trigili et al., 2011).

### **3.3. Resistencia a agentes quimioterapéuticos dirigidos contra el citoesqueleto.**

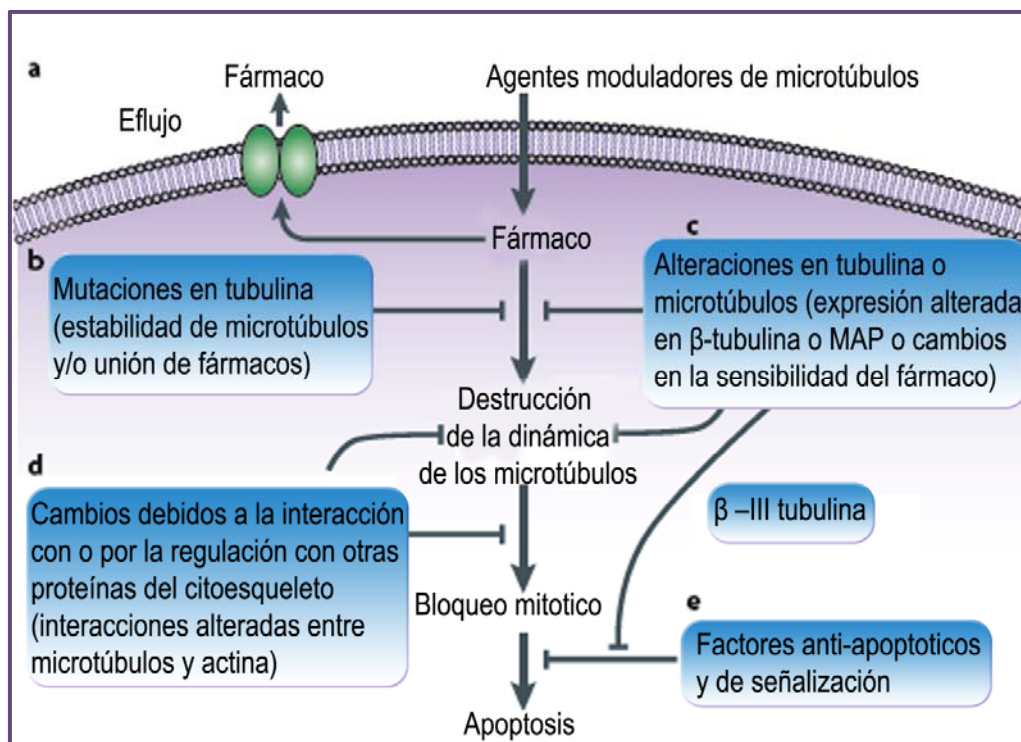
Finalmente, y como se ha mencionado previamente, no se puede hablar de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer sin mencionar los problemas consecuentes al tratamiento, entre los cuales cabe destacar el desarrollo de resistencias a los fármacos por parte de las células cancerosas (Harris and Hochhauser, 1992; Perez et al., 1993; Stavrovskaya, 2000). En muchos casos, este fenómeno representa la principal causa del fracaso del tratamiento antitumoral.

La viabilidad y el éxito de la quimioterapia contra el cáncer están relacionados tanto con factores dependientes del paciente (edad, estado general de salud, etc.) como del tumor (características biológicas del grado de respuesta, extensión total, etc.). Es de considerable importancia el fenómeno de la resistencia a los fármacos quimioterapéuticos, evento que se produce casi constantemente durante el curso de la quimioterapia contra el cáncer (Harris and Hochhauser, 1992; Pérez et al., 1993; Stavrovskaya, 2000).

Los tumores pueden desarrollar o adquirir resistencia durante el curso del tratamiento a pesar de haber presentado respuesta inicial al mismo (Booser and Hortobagyi, 1994). Se ha estimado que este fenómeno contribuye a más del 90 % de las muertes por cáncer (Lum et al., 1993); por tanto, representa un problema muy grave que puede conducir a la reaparición de la enfermedad e incluso a la muerte. Desafortunadamente, existen realmente numerosos procesos por los cuales las células cancerosas pueden resistir un tratamiento terapéutico, dependiendo estos últimos de muchas variables y teniendo lugar, a veces, varios de manera simultánea (Dumontet and Jordan, 2010).

Una vez que la droga ha alcanzado el citoplasma, se expone a diferentes mecanismos de detoxificación. Algunos de ellos siempre están presentes, mientras que otros son inducidos por la presencia de la droga. Incluso cuando el citostático ha alcanzado su último objetivo y ha provocado daño en el ADN, algunas células muestran resistencia a causa de la gran capacidad de reparación de ese daño (Masters, 1990). Niveles elevados de enzimas metabolizadoras de radicales libres, como superóxido dismutasa y catalasa, también se han encontrado asociados a este fenómeno (Stavrovskaya, 2000).

Se han observado diversas modificaciones en las células tumorales que las hacen resistentes al efecto de los agentes quimioterapéuticos descritos (Jordan and Wilson, 2004; Zhou and Giannakakou, 2005), tales como ciertas alteraciones en la dinámica de los microtúbulos, cambios en la regulación o expresión de proteínas asociadas a microtúbulos, diferencias en la expresión de los distintos isotipos de tubulina y mutaciones en el sitio de unión de los fármacos a tubulina; además de la aparición de resistencia múltiple a fármacos producida por la sobreexpresión de proteínas transportadoras con motivo de unión a ATP (*“ATP-binding cassette transporters”*) (Dumontet and Jordan, 2010). La figura 17 muestra los posibles mecanismos de resistencia a los moduladores del citoesqueleto.

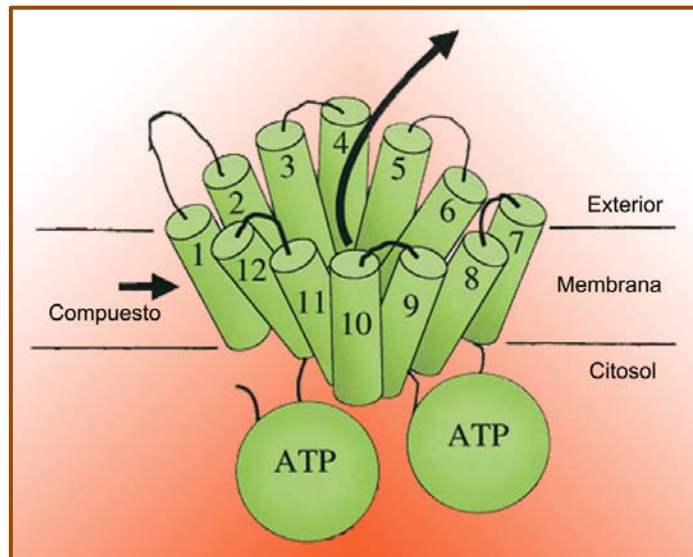


**Figura 17.** Diferentes mecanismos de resistencia. La farmacorresistencia es un fenómeno multifactorial y varios mecanismos han sido identificados para los moduladores del citoesqueleto en líneas celulares resistentes seleccionadas en muestras de laboratorio y clínicas. Estos mecanismos se pueden dividir en cinco categorías. **A:** Disminución en la acumulación intracelular de droga por sobreexpresión de proteínas transportadoras con motivo de unión a ATP. **B:** Alteración directa en la diana del fármaco debida a mutación. **C:** Expresión alterada de isotipos de tubulina o de proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs), que reduce la eficacia del fármaco (Verrills and Kavallaris, 2005). **D:** Cambios en los microtúbulos inducidos por la interacción o por la regulación con otras proteínas del citoesqueleto, tales como las proteínas moduladoras de la actina, que pueden afectar a la capacidad de los fármacos de inducir detención mitótica y muerte celular (Po'uha et al., 2010; Verrills et al., 2006a-b). **E:** Defectos en las vías de apoptosis (Bhalla, 2003). (Modificado de Kavallaris, 2010).

La resistencia oncológica a múltiples agentes antineoplásicos o MDR (*multiple drug resistance*) se considera como una de las mayores causas de fallo clínico en el tratamiento quimioterapéutico de pacientes con cáncer. El mecanismo de resistencia consiste en una disminución en la acumulación intracelular de droga por sobreexpresión de proteínas transportadoras con motivo de unión a ATP. Esta familia reúne un conjunto de proteínas de membrana que usan la energía de la hidrólisis de ATP para transportar sus

ligandos a través de ella (Ozben, 2006). Se conocen muchos miembros de la familia, la mayoría de los cuales tienen un ligando específico, pero algunos de ellos son capaces de transportar un amplio rango de moléculas hidrofóbicas. En este grupo de proteínas se clasifican siete subfamilias nombradas como ABC (*ATP-binding cassette*). Las principales proteínas cuya sobreexpresión se ha encontrado asociada a resistencia múltiple a drogas en células tumorales son ABCB1, ABCC1, ABCC2 y ABCG2 (Breuninger et al., 1995; Huisman et al., 2005; Hopper-Borge et al., 2004), siendo la primera (producto del gen humano *mdr1*, también conocida como glicoproteína P, gp-P), aparentemente, la mayor causante de este fenómeno y también la mejor caracterizada (Figura 18).

Entre las diferentes causas que generan alteraciones en este tipo de proteína, se ha demostrado que la exposición a los agentes carcinogénicos del tabaco eleva los niveles de gp-P en las células expuestas, predisponiéndolas más aun al fenómeno de la resistencia mediada por esta proteína (Zevin and Benowitz, 1999; Sharom, 1997).



**Figura 18.** Representación esquemática de la gp-P. La gp-P es una glicoproteína de alto peso molecular (170 kDa) y se conserva en tamaño y reactividad inmunológica entre especies diferentes. El estudio de las secuencias de gp-P muestra una estructura altamente conservada compuesta por una cadena polipeptídica de 1280 aminoácidos organizados en dos repeticiones en tándem de 610 aminoácidos, cada una unida entre sí por un segmento de unos 60. Cada “mitad” contiene un dominio intracelular de unión a nucleótido y un dominio transmembrana

(Hennessy and Spiers, 2007). La proteína está glicosilada en su primer lazo extracelular, fenómeno que parece influir en la estabilidad de la molécula, aunque su carencia no parece afectar al transporte de sus sustratos. Según los modelos más extendidos, cada dominio transmembrana consiste en seis hélices  $\alpha$  hidrofóbicas separadas por lazos hidrofílicos. (Modificado de Covers of The Journal of Biological Chemistry, 2003).

## **Objetivos**



La amplia diversidad estructural de los compuestos de la naturaleza cubre un amplio espectro de actividad contra una gran variedad de enfermedades (incluyendo trastornos anti-infeccioso, inmunológicos y neurológicos). Dentro de estas nosotros estamos especialmente interesados en las moléculas con actividad quimioterapéutica antitumoral.

Newman y sus colaboradores (Newman and Cragg, 2012) contabilizaron que más del 60% de los medicamentos aprobados para el tratamiento del cáncer en los años 1981-2010 eran productos naturales o derivados de ellos. A pesar de que algunos de dichos compuestos presentaron serias desventajas limitantes su aplicabilidad tales como la aparición de resistencias o los diversos efectos secundarios, su descubrimiento supuso, sin duda, una importante revolución en la lucha contra el cáncer.

En esta tesis se decidió explorar la posibilidad de tomar un compuesto de ellos como punto de partida para, utilizando la información obtenida, diseñar en una aproximación multidisciplinar y en colaboración con grupos de química orgánica, otras estructuras, híbridas o análogas de aquéllas, que exhibiesen al menos una fracción esencial de la actividad biológica observada, cuando no una actividad mejorada.

Para ello, nos propusimos los siguientes objetivos:

- Explorar la diana biológica de los compuestos objeto de estudio, así como su actividad a nivel del citoesqueleto (estabilizante o desestabilizante).
- Determinar las constantes de afinidad por dicha diana y número de sitios en esta de los productos a estudiar.
- Evaluar las interacciones con el sitio de unión, estudiando que características químicas las favorecen.
- Modelar dichas interacciones a partir de los datos estructurales obtenidos por RMN y *docking*.
- Determinar las citotoxicidades y estudiar los efectos celulares de la interacción de los compuestos, así como las diferencias que se observan con respecto a los más conocidos antimetabólicos utilizados en clínica (paclitaxel, docetaxel, citocalasina).





## ***Materiales y Métodos***



## **1. Productos químicos, tampones, ligandos, líneas celulares y condiciones de cultivo.**

### **1.1. Productos químicos.**

El dodecil sulfato sódico (SDS), el ácido etilen glicosamino tetracético (EGTA) el trifosfato de guanosina (GTP) y el difosfato de guanosina (GDP) proceden de Sigma. El Sephadex G25 y el DEAE Sephadex A50 proceden de Amersham. El DMSO (dimetilsulfóxido) grado espectroscopía, el DMSO-D<sub>6</sub> (dimetilsulfóxido deuterado) grado espectroscopía, el metanol grado analítico, el etanol grado espectroscopía, el fosfato monosódico y disódico grado analítico, el ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA), el cloruro de magnesio grado analítico, el sulfato de amonio puro y para análisis, la sacarosa grado para fines bioquímicos, el cloruro de potasio grado analítico, el ditiotreitól (DTT) grado para fines bioquímicos y el acetato de uranilo proceden de Merck. El glutaraldehído grado microscopía fue de Emscope. El borohidruro sódico procede de Sigma. El cloruro de guanidinio fue de United States Biochemical Corporation. El Triton X-100, el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (MTT), el polietilenglicol (PEG), el yoduro de propidio, la insulina, el pipes, el Hoechst 33342 y la seroalbúmina bovina (BSA) fueron de Sigma. La doxorubicina y el sulfato G418 procede de Calbiochem. El azul tripano fue de Serva (Feinbiochemica Heidelberg). El N,N-dimetilformamida (DMF), el glicerol y el formaldehído proceden de Merck. La amphotericina B fue de Gibco. El anticuerpo monoclonal  $\alpha$ -tubulina de ratón DM1A y el anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con FITC (G $\alpha$ Mlg) proceden de Sigma. La Faloidina Texas-Red fue de Molecular probes. La RNasa fue de Boehringer Mannheim GmbH. Los medios de cultivo RPMI 1640 y DMEM proceden de Gibco, al igual que todos los suplementos: L-glutamina, gentamicina, penicilina/streptomycin y sodio piruvato. Los sueros proceden de Sigma.

## 1.2. Tampones.

Tampón **GAB-x mM GTP**: 10 mM fosfato sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 3.4 M glicerol, 1 mM EGTA, 6 mM  $\text{MgCl}_2$  y x mM GTP, pH 6.5.

Tampón **PEDTAx-x' mM GTP**: 10 mM fosfato sódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 1 mM EDTA, x mM  $\text{MgCl}_2$  y x' mM GTP, pH 6.7.

Tampón **PEM**: 0.1 M Pipes, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1mM EGTA, pH 6.8.

Tampón **glicina**: 0.13 M glycine/NaOH, 0.2 M NaCl, 70% Glycerol, pH 8.6.

Tampón **PBS**: 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.2.

Tampón **G**: 5 mM Tris-HCl, 0.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM ATP, pH 8.0.

Tampón de **polimerización de actina 10X**: 100 mM Tris-HCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 mM KCl, 10 mM ATP, 0.05 M carbonato de guanidino, pH 7.5.

## 1.3. Ligandos.

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron una gran cantidad de compuestos provenientes de distintas colaboraciones con otros tantos grupos de química orgánica.

Los compuestos dictiostatina (**1**) y discodermolida (**3**), al igual que ocho dictiostatinas modificadas (**2**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**) y cinco híbridos discodermolida/dictiostatina (**12**, **13**, **14**, **15**, **16**) procedieron del grupo del Profesor Paterson de la Universidad de Cambridge, Reino Unido (Paterson et al., 2007; Paterson and Lyothier, 2004). Los análogos de dictiostatina (**11** y **17**) fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Gennari de la Universidad de Milán, Italia (Zanato et al., 2011).

El pelorusido A (**18**) procedió del laboratorio del Profesor Northcote de la Universidad Victoria de Wellington, Nueva Zelanda (West et al., 2000); los dos análogos semisintéticos modificados en la posición C24: el 24-O-cloroacetil pelorusido (**19**) y el 24-O-acetil pelorusido (**20**), fueron enviados desde el laboratorio del Profesor Paterson de la Universidad de Cambridge, Reino Unido (Singh et al., 2011).

La pironetina (**21**) y sus análogos (**22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33**) fueron sintetizados por el grupo del Profesor Marco de la Universidad de Valencia (Marco et al., 2011).

La podofilotoxina (**34a**) y los derivados del podofilotoxone, o compuesto **34c, (35 $\beta$ , 36 $\beta$ , 37 $\beta$ , 38 $\beta$ , 39 $\alpha$ , 39 $\beta$ , 40 $\alpha$ , 40 $\beta$ , 41)** fueron suministrados por el laboratorio del Dr. San Feliciano de la Universidad de Salamanca (Abad et al., 2012).

Los primeros tres macrólidos de la familia de amfidinolidas ((amfidinolida X (**42**) y los dos diólidos sintéticos estructuralmente relacionados (compuestos **43 y 44**)) se recibieron del laboratorio del Profesor Vilarrasa de la Universidad de Barcelona (Trigili et al., 2011). Durante el desarrollo del proyecto también surgió una colaboración con el laboratorio de la Profesora Cossy (*École Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle de la Ville de Paris*, Francia), de la cual recibimos otro compuesto de la misma familia, la amfidinolida J (**45**) (Barbazanges et al., 2008).

El paclitaxel (Schiff et al., 1979) fue donado por el Dr. Suffness del *National Cancer Institute* (Bethesda, Estados Unidos). El docetaxel (Bissery et al., 1991) es de Rhône Poulenc Rorer, Aventis (Schiltigheim, Francia). La molécula 7-0-[2,7-difluoro-4'-fluoresceincarbonil)-L-alanil] paclitaxel, conocida como flutax-2 (Evangelio et al., 1998), fue sintetizada en el laboratorio del Dr. Fang del Instituto de Materia Médica (Beijing, China). La citocalasina B y D fueron de Sigma. La colchicina y su análogo 2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenilo)-2,4,6-cicloheptatrieno-1-one (MTC) provinieron del laboratorio del Dr. Fitzgerald de la *Florida A&M University* (Florida, Estados Unidos). Las epotilonas (Bollag et al., 1995) fueron donadas por el Profesor Altmann del Instituto Federal Suizo de Tecnología (ETH) (Zurich, Suiza).

#### **1.4. Líneas celulares y condiciones de cultivo.**

Las células humanas de carcinoma de ovario A2780 y A2780AD (multirresistente a fármacos por sobreexpresión de la gp-P) (Louie et al., 1985), de pulmón A549 (Lieber et al., 1976) y de colon Lovo (Drewinko et al., 1976) se cultivaron en medio RPMI-1640. Las células humanas de carcinoma de cérvix

Hela S3 y Hela transfectada- $\beta$ -III (resistente a paclitaxel por sobreexpresión del isotipo  $\beta$ -III de tubulina), donadas por el Profesor Ludueña de la Universidad de Texas, USA (Joe et al., 2008; Risinger et al., 2008), y las células de riñón de rata canguro (*Potorous tridactylus*) PtK2 (Basehoar and Berns, 1973) se cultivaron en medio DMEM. Ambos medios (RPMI y DMEM) se suplementaron con un 10 % de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 40  $\mu$ g/mL gentamicina, 100 IU/mL penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina. Para las líneas A2780 y A2780AD el medio de cultivo se complementó además con 0.25 U/ml de insulina bovina. Para la línea Hela S3 el medio se suplementó con 0.5 mg/ml de amphotericina B y su línea resistente Hela transfectada- $\beta$ -III, además, con 0.25  $\mu$ g/ml de antibiótico G418.

Se emplearon además otra línea celular 1A9 (un clon de A2780) y tres mutantes derivados de ésta que presentan mutaciones en  $\beta$  tubulina: las líneas PTX10, PTX22 y A8, cultivadas en el mismo medio RPMI-1640 descrito anteriormente para la A2780. Las cuatro líneas celulares fueron donadas por la Dra. Giannakakou del *Weill Cornell Medical College* (New York, USA). Las dos primeras líneas (PTX10 y PTX22), resistentes a paclitaxel, se seleccionaron con paclitaxel y verapamilo (un inhibidor de la gp-P), con lo que se evita que la resistencia sea causada por sobreexpresión de esta bomba de membrana (Giannakakou et al., 1997). La A8 se seleccionó en presencia de epotilona A y verapamilo (Giannakakou et al., 2000). Las mutaciones en  $\beta$ -tubulina que causan esta resistencia se encuentran en el sitio de paclitaxel: en la línea PTX10 consiste en una mutación del residuo Phe270 por Val, en PTX22 se sustituye el residuo Thr por Ala364 y en las células A8 la mutación cambia Thr274 por Ile.

## **2. Caracterización de los ligandos.**

### **2.1. Método de análisis.**

Todos los compuestos nos fueron suministrados en estado sólido. Al recibirlos, se disolvieron en DMSO-D<sub>6</sub> a una concentración final de 5, 10 o 20 mM

(dependiendo de la solubilidad del compuesto) y se almacenaron a -80 °C. Las sucesivas diluciones se obtuvieron empleando solo DMSO y se almacenaron a -20 °C.

Se comprobó por centrifugación que su solubilidad en medio acuoso fuera al menos la concentración mayor utilizada en los respectivos ensayos.

### 2.1.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La separación de los compuestos se llevó a cabo mediante HPLC empleando un cromatógrafo Agilent 1100.

La tabla 3 muestra los distintos métodos de elución de dichos ligandos.

Compuestos	Método de elución
<b>1-17</b>	Columna de fase reversa C18, gradiente de acetonitrilo en agua del 30 al 100 % (5 min 30 %, 15 min gradiente, 5 min 100 %) durante 30 minutos y 1 ml/min de flujo.
<b>18-20</b>	Columna de fase reversa C18, sistema isocrático de dos pases: 10 min metanol/agua 60/40 (v/v) seguido por otro de 10 min metanol/agua 75/25 (v/v) y 1ml/min de flujo.
<b>21-33</b>	Columna de fase reversa C18, gradiente de acetonitrilo en agua del 50 al 80 % (5 min 50 %, 15 min gradiente, 5 min 80 %) durante 30 minutos y 1 ml/min de flujo.
<b>34a-41</b>	Columna Synergy Max-RP C12, gradiente de H <sub>2</sub> O + 0.1 % TFA/CH <sub>3</sub> CN + 0.1 % TFA del 45 % al 85 % durante 5 minutos y 0.6 ml/min de flujo.
<b>42-45</b>	Columna de fase reversa C18, sistema isocrático de acetonitrilo en agua 75/25 (v/v) durante 30 minutos y 1 ml/min de flujo.

**Tabla 3.** Se muestran los métodos de elución empleados, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), de los distintos compuestos estudiados.

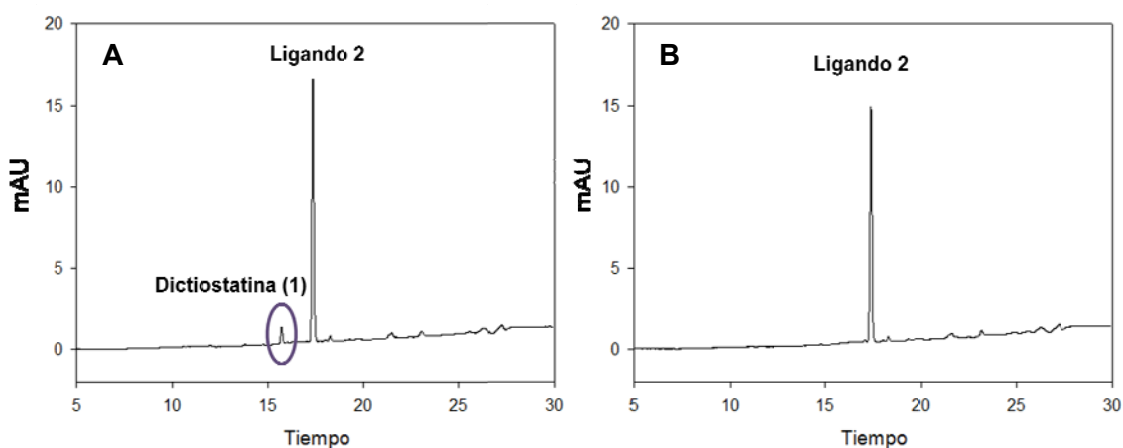
La detección de los compuestos fue posible gracias a la monitorización de su absorbancia a distintas longitudes de onda ( $\lambda$ ).



#### 2.1.1.1. Descontaminación de la muestra 2.

Posteriormente a la realización del ensayo de HPLC descrito anteriormente, el cromatograma del compuesto **2** mostró dos picos de absorción. Los tiempos de retención correspondientes a dichos picos y los dos espectros resultantes permitieron identificar la presencia del ligando **1** (1 %) en el tubo (Figura 19 A).

Para la descontaminación de la muestra **2**, en primer lugar se incubaron los microtúbulos (60  $\mu$ M) y el análogo contaminado **2** (1 mM) durante 30 minutos a 25 °C en el tampón GAB-1 mM GTP, pH 6.8. Sucesivamente, la mezcla se centrifugó a 50000 rpm durante 20 minutos a 25 °C en un rotor TLA 100 en una centrifuga Optima TLX de Beckman, para sedimentar los microtúbulos. El sobrenadante y el sedimento se separaron cuidadosamente tras la centrifugación. Conociendo la elevada afinidad del compuesto **1** a los microtúbulos (Buey et al., 2005), este último se encontró totalmente unido a los polímeros en el sedimento. Con el fin de comprobar su descontaminación, se volvió a cromatografiar el compuesto **2** en las mismas condiciones experimentales anteriormente descritas, observando esta vez un solo pico en el cromatograma (Figura 19 B). De este modo, el análogo **2** descontaminado pudo ser empleado en el presente estudio.



**Figura 19.** Análisis por cromatografía líquida de alta resolución del ligando **2**. **A:** Cromatograma del compuesto **2** contaminado con su molécula de referencia **1**. **B:** Cromatograma del ligando **2** después de su descontaminación.

### **2.1.2. Espectrofotometría en el ultravioleta-visible.**

Las muestras de compuesto (**1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17**) se disolvió en metanol para espectroscopia a una concentración final de 10, 20 o 50  $\mu\text{M}$  (dependiendo del compuesto) y la obtención de sus espectros de absorción en la zona del ultravioleta-visible se realizó en un espectrofotómetro Thermo Evolution 300 LC, en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

### **2.1.3. Espectrometría de masas.**

La caracterización de los compuestos **18, 19 y 20** por espectrometría de masas, realizados en el Centro de Investigaciones Biológicas gracias a la ayuda del Dr. José Javier Varela, se llevó a cabo en un sistema HPLC acoplado a espectrometría de masas. El sistema se compone de un cromatógrafo Surveyor (Thermo) acoplado a un espectrómetro de masas LXQ (Thermo Mod. Finnigan<sup>TM</sup> LXQ <sup>TM</sup>) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y un analizador de trampa iónica. La detección se llevó a cabo mediante electrospray en modo positivo (ESI+) aplicando un voltaje de 38 V y una temperatura al capilar de entrada de 275 °C. Como gas auxiliar y de nebulización se empleó nitrógeno (99.99 % puro). Los espectros de masas se registraron en el intervalo de masa/carga ( $m/z$ ) de 300 a 2000.

## **3. Proteínas.**

### **3.1. Purificación de tubulina.**

La tubulina empleada procedió de cerebros bovinos de edades inferiores a 12 meses, que fueron cedidos por el Matadero Municipal Vicente de Lucas, en Segovia. En la purificación de tubulina se siguió el protocolo de Weisenberg (Lee et al., 1973; Weisenberg et al., 1968) con algunas modificaciones (Andreu, 2007) y se emplearon una media de 8 a 9 cerebros. El procedimiento consistió en la homogeneización de los sesos usando un homogeneizador de aspas y posteriormente en la eliminación de las membranas celulares por centrifugación. A continuación, se procedió al fraccionamiento con sulfato amónico (32 %) y sucesivamente a la precipitación de la proteína (43 % sulfato

amónico). Este precipitado se resuspendió en el buffer referenciado, y se separó la tubulina mediante una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-Sephadex A50. La muestra resultante se precipitó de nuevo con sulfato amónico (43 %) y se resuspendió en un pequeño volumen del buffer referenciado para disponerlo a continuación en una columna de cromatografía de filtración en gel Sephadex G25. Seguidamente, se seleccionaron las fracciones que contenían tubulina funcional por precipitación con 30 mM de cloruro de magnesio. El exceso de magnesio se eliminó por diálisis durante toda la noche en un tampón que contenía 1 M sacarosa como estabilizador. Se determinó la concentración de tubulina espectrofotométricamente, diluyéndola 200 veces en 6 M de cloruro de guanidinio donde el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) de la tubulina a 275 nm es de  $107000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Andreu et al., 1984), y se alicuotó almacenando los viales en nitrógeno líquido. El rendimiento de la purificación resultaba entorno a los 400 mg de proteína, el 98 % de la cual era funcional.

Antes de la realización de cada experimento, la alícuota de proteína se descongeló rápidamente y se equilibró en el tampón deseado mediante cromatografía de filtración en gel Sephadex G25 en columna (0.9 x 25 cm). Midiéndose la absorbancia a 295 nm de las fracciones obtenidas, se identificó las que contenían proteína (absorbancia superior a 1), se juntaron y se clarificaron por centrifugación a 50000 rpm 10 minutos a 4 °C en un rotor TLA 120.2 en una centrifuga Optima TLX de Beckman. Se determinó la concentración final de tubulina espectrofotométricamente disolviéndola 20 veces en 10 mM fosfato sódico, 0.1 % SDS, pH 7.0.

### **3.2. Preparación de microtúbulos estabilizados.**

Para la preparación de microtúbulos estabilizados se partió de 40 mg de tubulina que se cargaron en una columna de cromatografía de filtración en gel Sephadex G25 (0.9 x 25 cm) previamente equilibrada con dos volúmenes del tampón GAB-0.1 mM GTP, en ausencia de  $\text{MgCl}_2$ , pH 6.8. Se seleccionaron las fracciones con una densidad óptica a 295 nm mayor de 1, se juntaron y se

centrifugaron a 50000 rpm 10 minutos a 4 °C en un rotor TLA 120.2 en una centrifuga Optima TLX de Beckman, para eliminar posibles agregados. La concentración de proteína se midió espectrofotométricamente tal y como se ha descrito previamente en el apartado anterior. Conociendo la concentración de tubulina se ajustó ésta a una concentración de 50 µM y se añadieron MgCl<sub>2</sub> y GTP a una concentración de 6 y hasta 1 mM respectivamente, comprobando que el pH fuera 6.5. La mezcla fue incubada durante 30 minutos a 37 °C en un baño de agua para inducir el ensamblaje de la tubulina. A continuación, se añadió glutaraldehído hasta una concentración final de 20 mM y la muestra se mantuvo otros 10 minutos a 37 °C en un baño de agua. El exceso de glutaraldehído fue eliminado añadiendo a las muestras 40 mM de borohidruro sódico (NaBH<sub>4</sub>), manteniéndola en hielo durante 10 minutos y eliminando luego las burbujas producidas mediante vacío o por centrifugación suave. La muestra fue sucesivamente dializada durante toda la noche empleando un casete de diálisis Slide-A-Lyzer 10K (Pierce) frente al tampón GAB-0.1 mM GTP.

Al día siguiente los microtúbulos estabilizados fueron congelados en nitrógeno líquido gota a gota y, posteriormente, almacenados en nitrógeno líquido (Díaz et al., 2000).

### **3.2.1. Medida de la concentración de sitios de unión de paclitaxel en microtúbulos estabilizados.**

La concentración total de tubulina se midió espectrofotométricamente tal y como se ha descrito previamente. Diluciones de microtúbulos estabilizados con una concentración final de 2 µM de tubulina se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con 5 µM de flutax-2 en presencia o ausencia de 100 µM de docetaxel. Las muestras se centrifugaron a 50000 rpm durante 20 minutos a 25 °C en un rotor TLA 100 en una centrifuga Optima TLX de Beckman, para sedimentar los microtúbulos. Los sobrenadantes y los sedimentos se separaron cuidadosamente tras la centrifugación. Los sedimentos fueron resuspendidos en una solución 10 mM fosfato sódico, 1 % SDS, pH 7.0, y tanto éstos como los sobrenadantes se diluyeron cinco veces en la misma solución. La concentración de flutax-2 se determinó espectrofluorimétricamente mediante la

interpolación en una curva patrón de los valores de emisión de fluorescencia obtenidos empleando una longitud de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) y de emisión ( $\lambda_{em}$ ) de 495 y 520 nm, respectivamente.

La cantidad de sitios de paclitaxel en los microtúbulos estabilizados se calculó restando la concentración de flutax-2 encontrado en el sedimento de las muestras tratadas en presencia de docetaxel a la del hallado en las muestras en ausencia de docetaxel. Este cálculo permitió determinar la concentración de flutax-2 unido reversiblemente en condiciones de saturación que será igual a la concentración de sitios de paclitaxel que se encuentran en los microtúbulos. Alrededor de un 95 % de los heterodímeros de tubulina en las preparaciones de microtúbulos estabilizados son capaces de unir paclitaxel reversiblemente.

La concentración de sitios de paclitaxel en estas muestras decae lentamente a 4 °C y tiene una vida media de pocas semanas. Sin embargo, su almacenamiento en nitrógeno líquido permite mantenerla constante durante años.

## **4. Efecto de los ligandos en células.**

### **4.1. Ensayo de citotoxicidad.**

Con el fin de averiguar el efecto citotóxico de los compuestos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 42, 43, 44 y 45**, las células se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de entre 12000 y 16000 células por pocillo (dependiendo de la línea celular empleada) en 80 µl de medio de cultivo. Al día siguiente se añadieron otros 20 µl de medio con diluciones seriadas de ligando cubriendo un amplio rango de concentraciones y se incubaron durante otras 48 o 72 h. A continuación se realizó el ensayo de MTT (Smith et al., 1988) con alguna modificación: se añadieron 20 µl de MTT (2.5 mg/ml) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente se detuvo la reacción añadiendo 100 µl de solubilizador de MTT (10 % SDS, 45 % DMF, pH 5.5). Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche para disolver los precipitados de formazán y se midió la absorbancia de cada pocillo a una  $\lambda =$

595/690 nm en un lector de placas Appliskan (Thermo). Los blancos usados fueron pocillos sin células y los controles de crecimiento pocillos con células que contenían la misma proporción de DMSO presente en los pocillos con compuesto. Las concentraciones inhibitorias 50 (CI50, concentración inhibitoria del 50; concentración de ligando a la que se observa una inhibición de la proliferación celular del 50 %) se calcularon de la curva dosis-respuesta y se expresaron como  $\pm$  error estándar de varios experimentos independientes.

#### **4.1.1. Ensayo de sinergia.**

Con el fin de identificar sinergia entre distintos compuestos estudiados (paclitaxel, **1**, **3**, **4**, **5**, **9**, **10**, **12**, **18** y epotilona A), se empleó inicialmente el método colorimétrico MTT descrito en el apartado anterior. Las células A2780 se trataron con las drogas durante 48 h empleando placas de 96 pocillos. Los tratamientos de combinación se realizaron al mismo tiempo que las curvas dosis-respuesta para cada compuesto individualmente. Las concentraciones de las combinaciones de ligandos se eligieron de acuerdo con las curvas dosis-respuesta obtenidas previamente. Se utilizaron concentraciones por debajo de la CI50 de cada compuesto para las combinaciones de los tratamientos (Wilmes et al., 2007). Se probaron al menos 3 concentraciones de cada compuesto, generalmente empezando por el 50 %, o inferior, de la CI50 incluyendo también a veces una concentración superior (25, 50 y 75 % de la CI50 representan buenas concentraciones de partida para comprobar la relación de combinación). Una vez encontrado un conjunto razonable de concentraciones sinérgicas se comprobó repetidas veces el experimento para llegar a una sólida evidencia estadística de sinergia.

Concentraciones mayores de la CI50 indicaron, por lo general, aditividad o antagonismo en lugar de sinergia debido a que el efecto de cada fármaco por separado es demasiado fuerte, enmascarando las interacciones sinérgicas sutiles.

#### 4.1.1.1. Análisis estadístico.

La interacción entre drogas se evaluaron a través del índice de combinación (CI) de Chou y Talalay (Chou and Talalay, 1984) y Berenbaum (Berenbaum, 1985):

$$CI = \frac{D_1}{D_{x1}} + \frac{D_2}{D_{x2}}$$

Valores de CI igual a 1 indican aditividad, valores menores de 1 sinergia y mayores de 1 antagonismo. Las dosis  $D_1$  y  $D_2$  representan las concentraciones utilizadas en la combinación, y las dosis  $D_{x1}$  y  $D_{x2}$  son las cantidades de cada fármaco cuando se administra sólo y que produciría la misma respuesta obtenida en presencia de los fármacos juntos. Para calcular la concentración de compuesto necesaria para una determinada respuesta por sí mismo, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Dose (x)} = CI50 \left[ \frac{(\text{max} - \text{respuesta})}{(\text{respuesta} - \text{min})} \right]^{1/\text{hillslope}}.$$

(Wilmes et al., 2011). Los valores de CI50, mínimo, máximo y hillslope se obtuvieron empleando el programa Sigma plot 11.0. Los valores de CI se compararon con un valor de 1.0 utilizando el programa GraphPad Prism v4.0. Los valores de  $P < 0.05$  se tomaron como significativos. Solo valores de  $CI \leq 0.8$  se tomaron como representación de una sinergia efectiva (Wilmes et al., 2011).

#### 4.2. Ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

Con el fin de determinar el efecto de los compuestos **1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34a, 35 $\beta$ , 36 $\beta$ , 37 $\beta$ , 38 $\beta$ , 39 $\alpha$ , 39 $\beta$ , 40 $\alpha$ , 40 $\beta$ , 41, 42, 43, 44 y 45** sobre la red de microtúbulos, los núcleos y los filamentos de actina, se sembraron las células a una densidad de 150000 células por ml en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos de 12 mm durante toda la noche. A la mañana siguiente se añadieron los ligandos a diferentes concentraciones o el volumen

equivalente de DMSO (cantidad residual de DMSO menor del 0.5 %) y se incubaron durante 4 o 24 horas. Para evitar perder las células despegadas, las placas se lavaron con PEMP (tampón PEM + 4 % de PEG) mediante centrifugación y las células en los cubres se permeabilizaron durante 90 segundos con 0.5 % Triton X-100 en PEM y se fijaron con 3.7 % formaldehído en PEM durante 30 minutos, como se ha descrito previamente (de Ines et al., 1994). Después de lavar con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -tubulina DM1A a una dilución 1/400 en PBS con BSA 3 % durante una hora a 37 °C, tras lo cual se lavaron dos veces en PBS y se incubaron durante una hora más con el anticuerpo de cabra anti inmunoglobulinas de ratón (marcado con FITC, a una dilución 1/200 en PBS con BSA 3 %). Los cubreobjetos se lavaron en PBS y el ADN y los microfilamentos se tiñeron con 10  $\mu$ g/mL Hoechst 33342 y Faloidina Texas-red 1/100 en PBS durante 30 minutos. Las muestras se examinaron y se fotografiaron usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan equipado con una cámara CCD Hamamatsu 4742-95.

#### **4.3. Análisis del ciclo celular.**

El efecto de los ligandos **1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34a, 35 $\beta$ , 36 $\beta$ , 37 $\beta$ , 38 $\beta$ , 39 $\alpha$ , 39 $\beta$ , 40 $\alpha$ , 40 $\beta$  y 41** sobre la progresión del ciclo celular se realizó determinando el contenido de ADN (teñido con ioduro de propidio) mediante citometría de flujo. Se incubaron 180000 células por ml en presencia de diferentes concentraciones de ligando durante 20 horas, se lavaron con PBS y se fijaron con etanol/agua 70/30 (v/v) a 4 °C al menos durante dos horas. Posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en 500  $\mu$ L de PBS, que contenía 60  $\mu$ g/mL de RNasa A libre de DNasa y 50  $\mu$ g/mL de ioduro de propidio. Las muestras se incubaron de nuevo a 37 °C durante 30 minutos y se analizaron en un citómetro de flujo Coulter Epics XL, tal como se ha descrito previamente (Andreu and Barasoain, 2001).



## **5. Efecto de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.**

### **5.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.**

#### **5.1.1. Ensamblaje en fosfato.**

Para cuantificar el efecto de los ligandos **18**, **19** y **20** en el ensamblaje de tubulina se incubaron mezclas de tubulina (20  $\mu$ M), equilibrada tal y como se ha descrito previamente, en el tampón PEDTA4-1 mM GTP en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos, durante 30 min a 37 °C. Las muestras se centrifugaron a 50000 rpm durante 20 min en un rotor TLA100, empleando una centrifuga Optima TLX de Beckman. Los sobrenadantes se recogieron cuidadosamente y los sedimentos se resuspendieron en 10 mM fosfato sódico, pH 7.0. La concentración de tubulina en los sobrenadantes y en los sedimentos se determinó utilizando el método Bradford (Bradford, 1976).

#### **5.1.2. Ensamblaje en fosfato y glicerol.**

Para evaluar el efecto de los ligandos **1**, **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33**, **34a**, **35 $\beta$** , **36 $\beta$** , **37 $\beta$** , **38 $\beta$** , **39 $\alpha$** , **39 $\beta$** , **40 $\alpha$** , **40 $\beta$**  y **41** en la modulación del ensamblaje *in vitro* y en condiciones en que la tubulina ensambla sin estabilizantes (por ejemplo en el tampón GAB), se cargó la proteína en una columna de cromatografía de filtración en gel Sephadex G25 (0.9 x 25 cm) previamente equilibrada con dos volúmenes del tampón GAB-0.1mM GTP. A continuación se detectaron las fracciones con proteínas, se clarificaron y se determinó la concentración de tubulina tal y como se ha descrito anteriormente. Sucesivamente se incubaron distintas concentraciones de tubulina, desde 10 hasta 25  $\mu$ M (dependiendo del compuesto), en presencia del ligando a una concentración 10 % en exceso sobre la concentración de tubulina.

Las mezclas se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en un baño de agua. Los microtúbulos formados en este tiempo se sedimentaron por centrifugación durante 20 minutos a 50000 rpm en un rotor TLA 100 precalentado a 37 °C utilizando una centrifuga Optima TLX de Beckman. Los sobrenadantes fueron retirados cuidadosamente y los sedimentos fueron

resuspendidos en 10 mM fosfato sódico, 1% SDS, pH 7.0. Ambas fracciones se diluyeron cinco veces en el mismo tampón. La concentración de tubulina se determinó espectrofluorométricamente en estas diluciones utilizando un espectrofluorímetro Fluorolog-3-221 (Jobin Yvon-Spex, Longjumeau, Francia) empleando una  $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm y una  $\lambda_{\text{em}} = 323$  nm. En cada experimento se calculó la concentración extrapolando los datos sobre una recta patrón realizada en paralelo.

## **6. Determinación de la unión y de las constantes de afinidad de los compuestos en microtubulos y tubulina.**

### **6.1. Determinación de la unión de los compuestos a tubulina.**

#### **6.1.1. Unión a microtúbulos estabilizados y nativos.**

Con el fin de determinar si los ligandos **18**, **19**, **20**, **42**, **43**, **44** y **45** se unían a microtúbulos estabilizados se incubaron en tampón GAB-0.1 mM GTP mezclas de concentraciones crecientes (hasta 10  $\mu\text{M}$ ) de microtúbulos estabilizados (preparados como se ha descrito previamente) en presencia de los compuestos objeto de estudio, durante 30 minutos en un baño termostático a una temperatura de 25 °C. Tras la incubación, las muestras se centrifugaron a 50000 rpm durante 20 minutos en un rotor TLA120.2 utilizando una centrifuga Optima TLX de Beckman. Los sobrenadantes se separaron cuidadosamente de los precipitados y éstos se resuspendieron en tampón 10 mM fosfato sódico, pH 7.0 (1 ml). Se añadió docetaxel (10  $\mu\text{M}$ ) a cada fracción a modo de estándar interno.

Los compuestos **18**, **19** y **20** se extrajeron por triplicado con un volumen de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y se resuspendieron en 40  $\mu\text{l}$  de metanol/agua 75/25 (v/v) (posterior a la evaporación del solvente). A continuación, dichas muestras se procesaron por HPLC en un cromatografo Agilent 1100 y se analizaron en un sistema isocrático de dos pases: 10 min metanol/agua 60/40 (v/v) seguido por otro de 10 min metanol/agua 75/25 (v/v), empleando un flujo de 1ml/min.

Los ligandos **42**, **43**, **44** y **45** se extrajeron de la misma manera que en el caso anterior y, a continuación, se resuspendieron en 25  $\mu\text{l}$  de metanol/agua

70/30 (v/v). Sucesivamente, las muestras se procesaron por HPLC en un cromatografo Agilent 1100 y se analizaron durante 30 minutos en un sistema isocrático de acetonitrilo en agua 75/25 (v/v), empleando un flujo de 1ml/min.

La estequiometria de unión del compuesto **18** a microtúbulos estabilizados se determinó incubando 10  $\mu$ M de sitios de unión de paclitaxel en microtúbulos estabilizados en presencia de concentraciones crecientes de compuesto (hasta 25  $\mu$ M) en tampón GAB-0.1 mM GTP, durante 30 min a 25 °C en un termobloque Termostat Plus (Eppendorf). Los microtúbulos con el ligando unido se separaron del ligando no unido por centrifugación a 50000 rpm empleando un rotor TLA100 en una centrifuga Optima TLX de Beckman. Los sobrenadantes se separaron cuidadosamente de los precipitados y éstos se resuspendieron en tampón 10 mM fosfato sódico, pH 7.0 (1 ml). Se añadió docetaxel (10  $\mu$ M) a cada fracción a modo de estándar interno. Los compuestos se extrajeron por triplicado con un volumen de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se resuspendieron en 40  $\mu$ l de metanol/agua 75/25 (v/v) (posterior a la evaporación del solvente). A continuación, las muestras se procesaron por HPLC en un cromatografo Agilent 1100 y se analizaron en un sistema isocrático de dos pases: 10 min metanol/agua 60/40 (v/v) seguido por otro de 10 min metanol/agua 75/25 (v/v), empleando un flujo de 1ml/min. La concentración de tubulina en los sobrenadantes y en los sedimentos se midió utilizando el método Bradford (Bradford, 1976). Los compuestos se cuantificaron mediante la comparación de las áreas integradas del pico de HPLC correspondiente con la de los estándares.

Con el fin de determinar si los ligandos **18**, **19**, **20**, **42**, **43**, **44** y **45** se unían a los microtúbulos nativos, se incubó la tubulina (20  $\mu$ M) en tampón PEDTA6-1 mM GTP, durante 30 min a 37 °C en un termobloque Termostat Plus (Eppendorf), en presencia de concentraciones crecientes (hasta 30  $\mu$ M) de compuesto. Los microtúbulos que se formaron se sedimentaron como se ha descrito anteriormente, y las concentraciones de tubulina y ligando en los sedimentos y en los sobrenadantes se cuantificaron como se ha detallado previamente.

La afinidad de unión de los compuestos **18**, **19** y **20** a los microtúbulos se determinó incubando el ligando (0.5  $\mu\text{M}$ ) en presencia de diferentes concentraciones de microtúbulos estabilizados (hasta 8  $\mu\text{M}$ ) a diferentes temperaturas. Los microtúbulos con el ligando unido se separaron del ligando no unido y se analizaron como se ha descrito anteriormente.

#### **6.1.2. Unión a tubulina dimerica.**

La unión del compuesto **3** al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina fue determinada por centrifugación. A una concentración fija de ligando problema (50  $\mu\text{M}$ ), en 10 mM fosfato sódico, 0.1 mM GTP, pH 7.0 se fueron añadiendo concentraciones crecientes de tubulina dimerica (hasta 40  $\mu\text{M}$ ) que previamente se había equilibrado en el tampón PEDTA1.5-0.1 mM GTP, pH 7.0. Las muestras se incubaron a 25 °C durante 30 minutos y tras la incubación fueron centrifugadas en una centrifuga Optima TLX de Beckman a 100000 rpm durante 2 horas a 25 °C utilizando un rotor TLA 100.2. Finalizada la centrifugación, se tomaron cuidadosamente los 500  $\mu\text{l}$  superiores e inferiores de la reacción y el precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón 10 mM fosfato sódico, 0.1 mM GTP, pH 7.0. Dado que los compuestos no absorbían en el ultravioleta cercano, la concentración de tubulina de ambas mitades se calculó espectrofotométricamente utilizando su coeficiente de extinción de  $107000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 275 nm, en 10 mM de tampón fosfato 1 % SDS y empleando un espectrofotómetro Thermo Evolution 300 LC. Se añadió docetaxel (10  $\mu\text{M}$ ) a cada fracción a modo de estándar interno. Los compuestos se extrajeron por triplicado con un volumen de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se resuspendieron en 25  $\mu\text{l}$  de metanol/agua 60/40 (v/v) (posterior a la evaporación del solvente). Posteriormente, la cantidad de compuesto en cada muestra se analizó por HPLC empleando un cromatografo Agilent 1100 y cargando 30  $\mu\text{l}$  en una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm). Las muestras se cromatografiaron en un gradiente de metanol/agua del 60 al 70 % (5 min 60 %, 15 min gradiente, 5 min 70 %) durante 30 minutos y con un flujo de 1ml/min.

## **6.2. Determinación del sitio y de las constantes de unión de los compuestos en microtúbulos y tubulina no ensamblada.**

### **6.2.1. Unión de los compuestos al sitio de paclitaxel.**

#### **6.2.1.1. Medida de anisotropía de fluorescencia y determinación de las constantes de afinidad de los ligandos en microtubulos estabilizados: ensayo de desplazamiento de flutax-2.**

La anisotropía de fluorescencia representa la polarización de la luz emitida tras la excitación de una determinada muestra con luz polarizada. La despolarización de luz puede ser debida a diferentes fenómenos, mayoritariamente inherentes al tipo de muestra, como la difusión rotacional del fluoróforo (Lakowicz, 1999). Las medidas de anisotropía cuantifican el desplazamiento angular promedio que ocurre entre la absorción y la consecuente emisión de un fotón por parte del fluoróforo. Este desplazamiento dependerá en gran medida del tamaño y la forma del fluoróforo que rota. Dado que la diferencia en los valores de difusión rotacional del flutax libre y unido a microtúbulos es muy grande, se puede utilizar la anisotropía de fluorescencia para distinguir entre estos dos estados del flutax.

Con el fin de averiguar si los compuestos **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 42, 43 y 44** se unían al sitio de paclitaxel en los microtúbulos estabilizados, se midió el cambio de los valores de anisotropía de fluorescencia de la molécula de flutax-2, en presencia de su sitio de unión y de los ligandos a estudiar (Buey et al., 2004). Se preparó una mezcla de 50 nM de flutax-2 y 50 nM de sitios de paclitaxel en microtúbulos estabilizados en GAB-1 mM GTP. Se distribuyeron 200 µl de la mezcla en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, obviándose los de los bordes. Sobre esta mezcla, se añadieron concentraciones crecientes del ligando problema (hasta 100 µM). Las mezclas de reacción se incubaron en un agitador orbital durante al menos 10 minutos y se midieron los valores de anisotropía de cada pocillo a distintas temperaturas, después de incubar durante 20 minutos bajo cada condición, utilizando un lector de placas Appliskan (Thermo). Las muestras fueron excitadas con pulsos de luz polarizada verticalmente (usando un filtro 485P, con un paso de banda de 480-492 nm) y la emisión se analizó simultáneamente con filtros de

polarización horizontal y vertical (usando un filtro 520P, con un paso de banda de 515-550 nm). La ganancia de ambos canales se ajustó en base a la anisotropía del flutax-2 libre ( $r = 0.055$  y polarización = 0.080, en tampón GAB a 25 °C) en pocillos que contenían flutax-2 sin microtúbulos. Los blancos se midieron en pocillos con microtúbulos sin flutax-2 y se restaron de los valores de intensidad de fluorescencia de cada pocillo.

Como se ha descrito anteriormente, en este ensayo el ligando de referencia es el flutax-2, cuya constante de unión a los microtúbulos es conocida. De esta forma, con las medidas de anisotropía es posible calcular la saturación fraccional ( $v$ ) para cada concentración de ligando competidor

$$(v = \frac{[\text{flutax2}]_{\text{unido}}}{[\text{sitios}]_{\text{total}}}).$$

Al ser una propiedad aditiva, la anisotropía de una mezcla determinada será la suma de la anisotropía de sus componentes, cuantificada por sus fracciones molares, no cambiando por ello su rendimiento cuántico (Lakowicz, 1999). Las anisotropías del flutax-2 en los dos estados de referencia (unido en ausencia de competidor,  $r_o$  y totalmente desplazado, o libre,  $r_{\min}$ ) son conocidas y la unión del ligando flutax-2 en ausencia de competidor ( $v_o$ ) se puede calcular a partir de la concentración de flutax-2 inicial, de los sitios de unión y de la constante de afinidad. De esta manera, los valores de anisotropía medidos  $r_x$  pueden ser transformados en valores de saturación fraccional  $v_x$  empleando la siguiente ecuación:

$$v_x = v_o \frac{(r_x - r_{\min})}{(r_o - r_{\min})}$$

La constante de unión del ligando problema  $K(l)$  se puede determinar a partir de los valores conocidos de la constante de unión del ligando de referencia  $K(r)$  y de las concentraciones de los sitios de unión, flutax-2 y ligando problema mediante la resolución de las siguientes ecuaciones:

$$K(l) = \frac{[\text{ligando}]_{\text{unido}}}{[\text{sitios}]_{\text{libres}} [\text{ligando}]_{\text{libre}}}$$

$$K(r) = \frac{[flutax2]_{unido}}{[sitios]_{libres} * [flutax2]_{libre}}$$

$$\frac{K(l)}{K(r)} = \frac{[ligando]_{unido} * [flutax2]_{libre}}{[flutax2]_{unido} * [ligando]_{libre}}$$

$$[Flutax2]_{libre} = [flutax2]_{total} - [flutax2]_{unido}$$

$$[Flutax2]_{libre} = [flutax2]_{total} - [flutax2]_{unido}$$

$$[Ligando]_{libre} = [ligando]_{total} - [ligando]_{unido}$$

$$[Sitios]_{libres} = [sitios]_{total} - [ligando]_{unido} - [flutax2]_{unido}$$

Sustituyendo se llega a la siguiente ecuación:

$$\frac{K(l)}{K(r)} = \frac{[ligando]_{unido} * ([flutax2]_{total} - [sitios]_{total} - [ligando]_{unido})}{([sitios]_{total} - [ligando]_{unido}) * ([ligando]_{total} - [ligando]_{unido})}$$

Se empleó un programa específicamente desarrollado en nuestro laboratorio (J.F. Díaz, Equigra v5.0, no publicado) para realizar un ajuste por mínimos cuadrados del valor de la constante de equilibrio de unión del ligando competidor K(l) a los datos de  $v_x$  vs  $[ligando]_{total}$ , empleando la última ecuación mostrada a partir de los valores conocidos de  $[flutax2]_{total}$ ,  $[sitios]_{total}$ ,  $[ligando]_{total}$  y K(r) (Díaz and Buey, 2007).

#### 6.2.1.2. Ensayo de desplazamiento de epotilona B.

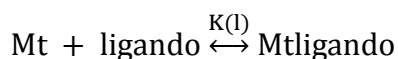
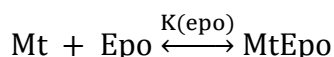
No es posible medir las constantes de unión de los compuestos de muy alta afinidad (**4**, **6**, **9** y **12**) con el método anterior, ya que son muy diferentes de la constante del ligando de referencia flutax-2 y el error es muy grande (Díaz and Buey, 2007). Por esta causa se diseñó una forma alternativa de medirlas por desplazamiento de epotilona B que tiene una constante de unión al sitio de paclitaxel mayor (Buey et al., 2004). Dado que el análisis de los datos en este tipo de ensayos de competición se basa en el desplazamiento estequiométrico

del ligando de referencia (Díaz and Buey, 2007), todo compuesto que sobrepase en tres órdenes de magnitud la afinidad del ligando de referencia se comportará básicamente igual, no observándose diferencias entre ellos, puesto que el ensayo se fundamenta en las cantidades del ligando de referencia libres y unidas a su sitio. Como supuesto clarificador se puede pensar en una mezcla que contenga una concentración 100 nM de un ligando problema, 100 nM de un compuesto de referencia (con una constante de unión de  $10^7 \text{ M}^{-1}$ ) y 100 nM de sitios. La proporción de ligando de referencia libre dependerá en este caso de la afinidad del problema siguiendo estas pautas: si la constante problema es de  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , el porcentaje de ligando libre será el 76.6 %; si es  $10^8 \text{ M}^{-1}$ , entonces el ligando libre será el 81.9 %; con  $10^9 \text{ M}^{-1}$  será el 92.8 %; con  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  llegará al 97.5 y para una constante de  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  el ligando libre será el 99.2 %. Así pues con un ligando de referencia de estas características se podrán medir con cierta precisión las afinidades de compuestos cuyas constantes de unión estén entre  $10^7$  y  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , pero será difícil distinguir entre dos ligandos de constantes en el orden de  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ .

Para las medidas de las constantes de afinidad por desplazamiento de epotilona B se procedió como se describe en Matesanz et al., 2008: se distribuyó 1 ml de GAB con 1  $\mu\text{M}$  de sitios en microtúbulos estabilizados y 1.1  $\mu\text{M}$  de epotilona B en cada tubo. A continuación en cada uno se añadió 1.1  $\mu\text{M}$  del compuesto problema a cada uno de los tubos, o el correspondiente volumen de DMSO (vehículo) en el tubo control. Las mezclas se incubaron a 25, 30, 35, 40  $^{\circ}\text{C}$  durante media hora y se centrifugaron durante 20 minutos a 50000 rpm en un rotor TLA 120.2 en una centrifuga Optima TLX de Beckman a la temperatura correspondiente. Tras la centrifugación, se separaron los sobrenadantes y los sedimentos se resuspendieron en 1 ml de tampón 10 mM fosfato sódico, pH 7.0. A cada fracción de reacción se le añadió 1  $\mu\text{M}$  de paclitaxel como patrón interno de la extracción orgánica. Los compuestos se extrajeron con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por triplicado y se resuspendieron en 30  $\mu\text{l}$  de metanol (posterior a la evaporación del solvente), tras lo cual se cargaron 25  $\mu\text{l}$  de cada uno en una columna de HPLC Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm) y se cromatografiaron en un gradiente de acetonitrilo/agua del 30 al 100 % (5 min 30



%, 15 min gradiente, 5 min 100 %) durante 30 minutos y con un flujo de 1ml/min. Las áreas bajo los picos de los compuestos en los cromatogramas permitieron calcular la concentración de los ligandos en el sedimento (y por tanto unidos a microtúbulos) y consecuentemente en el sobrenadante (libres). La relación de las concentraciones del ligando problema y de epotilona B permitieron obtener la relación entre las constantes de unión de los dos compuestos, y de esta manera calcular la constante de interés como prosigue:



$$\frac{K(\text{l})}{K(\text{epo})} = \frac{[\text{Mtligando}] * [\text{Epo}]}{[\text{ligando}] * [\text{MtEpo}]}$$

$$K(\text{l}) = K(\text{epo}) \frac{[\text{Mtligando}] * [\text{Epo}]}{[\text{ligando}] * [\text{MtEpo}]}$$

### 6.2.2. Unión de los compuestos al sitio de colchicina: ensayo de desplazamiento de MTC.

Con el ánimo de examinar el sitio de colchicina como posible sitio de unión de algunos de los compuestos ensayados (**34a**, **35β**, **36β**, **37β**, **38β**, **39α**, **39β**, **40α**, **40β**, **41**, **42**, **43** y **44**), se estudiaron éstos en presencia de tubulina y del análogo de colchicina 2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (MTC). Sabiendo que el MTC en estado libre manifiesta una fluorescencia despreciable y unido a la tubulina emite dos máximos de fluorescencia a  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 423 \text{ nm}$  (Andreu et al., 1984), se llevó a cabo un ensayo de competición en condiciones de tubulina no ensamblada (preparándose la tubulina tal y como se ha descrito previamente) añadiendo concentraciones crecientes de los compuestos estudiados a una mezcla de 10  $\mu\text{M}$  MTC y 10  $\mu\text{M}$  tubulina en el tampón PEDTA-0.1 mM GTP y posteriormente incubando las mezclas durante 30 minutos a 25 °C. De esta manera, los cambios en el

espectro de emisión de fluorescencia del MTC permitieron la medida indirecta del compuesto al sitio de unión de colchicina. Un apagamiento de dicha emisión revelará un desplazamiento del MTC de dicho sitio por el compuesto ensayado.

### **6.2.3. Unión de los ligandos al sitio en $\alpha$ -tubulina: ensayo de competición con pironetina.**

Con el fin de comprobar el sitio de unión de los análogos de pironetina al dímero de tubulina, se incubaron 200  $\mu$ l de tubulina (25  $\mu$ M) en el tampón GAB en presencia de 200  $\mu$ M de los respectivos análogos elegidos (**23**, **24**, **25**, **27**, **30** y **31**, seleccionados como ejemplos representativos) o de 10  $\mu$ l de DMSO (vehículo) durante 15 min a 37 °C. Se añadió la pironetina a una concentración de 30  $\mu$ M y se incubó la mezcla durante otros 15 minutos. A cada fracción de reacción se le añadieron 10  $\mu$ M de docetaxel como patrón interno. Se extrajeron los compuestos por triplicado con un volumen de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se resuspendieron en 35  $\mu$ l de acetonitrilo/agua 50/50 (v/v) (ulterior a la evaporación del solvente). Posteriormente, la cantidad de pironetina que no reaccionó se determinó por HPLC en un cromatógrafo Agilent 1100. Las muestras que contenían la pironetina y los compuestos **27**, **30** y **31** se analizaron empleando una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm) y un gradiente de acetonitrilo/agua del 50 al 80 % (5 min 50 %, 15 min gradiente, 5 min 80 %) utilizando un flujo de 1ml/min durante 30 minutos a una  $\lambda$  = 230 nm. Las muestras que contenían la pironetina y los compuestos **23**, **24** y **25** se analizaron utilizando dos columnas secuencialmente conectadas ((una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm) y Supercosil LC18DB (4.6 x 250 mm)) y un gradiente de acetonitrilo/agua del 60 al 80 % durante 30 minutos con un flujo de 1ml/min. Como en el caso anterior, la detección fue seguida a una  $\lambda$  = 230 nm.

## 7. Estructura de los microtúbulos inducidos por ligandos.

### 7.1. Determinación del diámetro de los microtúbulos (SAXS: *small angle X-ray scattering*).

Con el fin de determinar el diámetro de los microtúbulos en presencia de los ligandos **1, 3, 5, 6, 11, 12, 14 y 15**, la tubulina fue equilibrada en el tampón PEDTA5-0.1 mM GTP ó 7-0.1 mM GTP a pH 6.8 (tal y como se ha descrito anteriormente) e incubada durante 1 hora y 6 minutos (utilizando un gradiente de temperatura que se inició en 4 °C hasta alcanzar una temperatura de 37 °C) con un exceso de concentración del ligando objeto de estudio antes de registrar su patrón de dispersión.

Las medidas de SAXS fueron tomadas en el Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR, CSIC), con la ayuda de la Dra. Aurora Nogales, utilizando el sistema Bruker NANOSTAR. La cámara de detección se situó a una distancia tal como para cubrir un rango de vectores de dispersión  $S$  (definido como el inverso del espaciado de Braggs,  $2(\sin\theta)/\lambda$ ) desde 0.013 hasta 0.22  $\text{nm}^{-1}$ . Los valores absolutos de los vectores de dispersión se obtuvieron mediante un detector calibrado con behenato de plata. Se acumuló cada señal durante 30 minutos, por un total de 4 medidas por cada muestra (2 horas totales), manteniendo la temperatura de la muestra a 25 °C durante el registro de datos. El procesamiento de datos se realizó usando el software SAXS de Bruker.

Los datos sin procesar se normalizaron por la transmisión de la respuesta de la muestra antes de promediar y restando el patrón del tampón de la dispersión normalizada.

El perfil de SAXS de los microtúbulos es característico de la función de Bessel para un cilindro cuyo máximo  $J_0$  es proporcional al diámetro del cilindro ( $D$ ) en la relación:

$$J_0 = \frac{1.22}{D}$$

(Abramowitz and Stegun, 1965).

Conociendo el diámetro del microtúbulo y de reconstrucción helicoidal llevada a cabo por difracción de fibra (Amos and Klug, 1974) o por SAXS (Andreu et al., 1992; Andreu et al., 1994; Díaz et al., 1994), así como el ancho del protofilamento se pudo calcular el número de protofilamentos.

En presencia del compuesto **18**, las medidas de dispersión de rayos X se efectuaron en la estación 2.1 (difracción no cristalina con resolución temporal) de la fuente de radiación de sincrotrón de Daresbury (Reino Unido).

Previamente al registro del patrón de dispersión de cada muestra, la tubulina fue equilibrada tal y como se ha descrito anteriormente y muestras de proteína y exceso de compuesto estudiado se incubaron durante 30 minutos a 37 °C en tampón PEDTA7-1 mM GTP, pH 6.7 en baño de agua. La cámara de detección se situó a una distancia de 3 metros de la muestra cubriéndose un rango de vectores de dispersión  $S$  desde 0.02 hasta 0.33 nm<sup>-1</sup>. La intensidad de los rayos X fue de aproximadamente 4 x 10<sup>11</sup> fotones s<sup>-1</sup> en una sección de muestra de 0.6 x 7 mm<sup>2</sup>. Los valores absolutos de los vectores de dispersión se calibraron empleando una muestra de colágeno de cola de rata (Andreu et al., 1992). Los perfiles de dispersión se registraron cada 15-60 segundos. Se redujeron los daños por radiación producidos en la muestra debido a la elevada intensidad del haz, colocando dicha muestra en una celda oscilante. En caso de daño por radiación, los datos afectados no fueron incluidos en el análisis posterior. El procesamiento de datos se realizó usando el conjunto de programas facilitado por el proyecto “Software for Small-Angle Scattering” (<http://www.small-angle.ac.uk/small-angle/Software.html>).

Previo a su procesado, los datos se normalizaron por la intensidad del haz y por la respuesta del detector.

El perfil de SAXS, el diámetro y el número de protofilamentos de los microtúbulos se calculó como se ha explicado anteriormente.

## **8. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a tubulina y microtúbulos.**

### **8.1. Ultracentrifugación analítica.**

El estado de oligomerización de las muestras de tubulina, que se emplearon en los experimentos de resonancia magnética nuclear (RMN), se analizó por velocidad de sedimentación en el Servicio de Ultracentrifugación Analítica del Centro de Investigaciones Biológicas, utilizando una ultracentrífuga analítica Optima TLX de Beckman equipada con un detector de interferencia y absorbancia, utilizando un rotor doble An50Ti y células de doble sector, centrifugando a 43000 o 50000 rpm a una temperatura de 25 °C. Las distribuciones diferenciales de coeficiente de sedimentación,  $c(s)$ , se calcularon por modelado límite de mínimos cuadrados de los datos de velocidad de sedimentación utilizando el programa SEDFIT (Schuck, 2000; Schuck et al., 2002). El promedio de los valores medidos de coeficiente de sedimentación en el tampón D<sub>2</sub>O a 25 °C se corrigió para la composición del disolvente y temperatura a la de H<sub>2</sub>O a 20 °C, s20w, utilizando el programa SEDNTERP recuperado del server RASMB (Laue, 1992).

### **8.2. Resonancia magnética nuclear (RMN).**

La interacción de los ligandos con tubulina dimerica y microtúbulos se caracterizó por Don Javier Rodriguez, en nuestro laboratorio, y la Dra. Angeles Canales, dentro de la colaboración que mantenemos con el Profesor Jiménez-Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid.

Los experimentos monodimensionales de diferencia de transferencia de saturación (STD) y bidimensionales de efecto nuclear transferido Overhauser (TR-NOESY) se desarrollaron tal y como se describe en Canales et al., 2011.

Los experimentos de STD detectan la transferencia de magnetización de una proteína a un ligando, siempre que esté unido. Sólo los compuestos unidos muestran señales y el efecto observado depende de la distancia entre la proteína y los protones del ligando, proporcionando así una herramienta útil para detectar los epítomos del ligando y sondear la región del farmacóforo. El

STD también depende de la afinidad de unión, de las concentraciones del ligando y receptor, de los tiempos de correlación rotacional y de la frecuencia del espectrómetro.

El experimento de NOE transferido (TR-NOE) permite conocer la conformación bioactiva de ligandos en el sitio de reconocimiento de receptores macromoleculares. El TR-NOESY se realiza mediante una secuencia NOESY normal aplicada a un ligando en intercambio entre su estado libre y asociado.

### **8.3. Modelado molecular**

#### **8.3.1. Estudio de los compuestos estabilizantes de microtúbulos.**

Los experimentos de modelado molecular en presencia del compuestos **3** se realizaron por Don Javier Rodriguez, en nuestro laboratorio, tal y como se describe en Canales et al., 2011.

El *docking* molecular del compuesto en examen se evaluó utilizando el programa AutoDock 4.0 (Morris et al., 1998).

Los complejos de pelorusido A (**18**) y de sus dos análogos 24-O-cloroacetil pelorusido (**19**) y 24-O-acetil pelorusido (**20**) con la tubulina fueron evaluados por el Dr. Oriol Pineda de la Universidad de Barcelona, tal y como se describe en Pera et al., 2010.

El *docking* molecular del compuesto en examen se evaluó utilizando el programa AutoDock 3.05 (Morris et al., 1998).

El objetivo de dichos experimentos es la identificación de la posición de unión de los ligandos estudiados a su diana.

#### **8.3.2. Estudio de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos.**

Los experimentos destinados al estudio del modelado molecular de los compuestos desestabilizantes de microtúbulos unidos a tubulina se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. San Feliciano, en particular del Dr. López-Pérez, de la Universidad de Salamanca.

El *docking* molecular de dicho compuesto en presencia de tubulina se evaluó utilizando el programa AutoDock 2.0. Durante la simulación se

realizaron 100 carreras utilizando el algoritmo genético de Lamarckian, dándonos cada una de ellas un modo de enlace, y agrupándolas al final de la simulación.

#### **8.4. Cristalografía.**

Los experimentos de cristalografía que nos permitieron confirmar la unión del compuesto **3** unido a su sitio de unión en los microtúbulos, determinada anteriormente por experimentos de RMN, se realizaron por el Dr. Andrea Prota y la Dra. Katja Bargsten en el laboratorio del Dr. Steinmetz, del *Paul Scherrer Institut*, Villigen PSI (Suiza), tal y como se describe en Prota et al., 2013.

### **9. Interacción de los compuestos con actina y microfilamentos.**

#### **9.1. Estudios de polimerización y despolimerización de actina.**

Para evaluar el efecto de los compuestos **42**, **43**, **44** y **45** sobre la modulación del ensamblaje de actina se utilizó el kit Biochem de polimerización de actina (*Actin Polymerization Biochem Kit*) de Cytoskeleton. Este kit se basa en el incremento de fluorescencia de la actina, en este caso conjugada con un fluoróforo (*pyrene labeled muscle actin*), durante la polimerización. De este modo, se puede monitorizar la fluorescencia que se emite cuando la actina globular (G-actina) conjugada con el fluoróforo forma la actina filamentosa (F-actina) para seguir su polimerización en el tiempo. De la misma manera, se puede utilizar la F-actina preformada y seguir, en este caso, la despolimerización. En este tipo de ensayos se pueden añadir a la mezcla de reacción tanto células o extractos de tejidos como proteínas purificadas para, de este modo, identificar su efecto sobre la polimerización de actina.

En concreto, para averiguar el efecto de nuestros compuestos sobre el desensamblaje de actina se disolvieron 0.4 mg de actina marcada con el fluoróforo en 400 µl de tampón G (Cytoskeleton) (concentración final de la actina 1 mg/ml). Se indujo la polimerización de la proteína incubándola durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia de 10 µl del tampón de polimerización de actina 10X (Cytoskeleton). A continuación, se añadieron los

ligandos a la concentración deseada o DMSO (vehículo) y se midieron las emisiones de fluorescencia de las muestras ( $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 407 \text{ nm}$ ) cada minuto hasta un total de 1 hora utilizando una placa de 96 pocillos, en un Thermo Varioskan Flash.

Los compuestos que actúen como agentes despolimerizantes de actina inducirán el desensamblaje de los filamentos de modo que se detectará una disminución de la emisión de fluorescencia a lo largo del tiempo con respecto a la muestra control (DMSO) (Kouyama and Mihashi, 1981).

Para examinar la influencia de los ligandos sobre el ensamblaje de actina, se disolvieron 0.1 mg de actina conjugada con el fluoróforo en 225  $\mu\text{l}$  de tampón G (Cytoskeleton) (concentración final de la actina 0.4 mg/ml) y se centrifugó a 14k rpm durante 30 minutos a 4 °C en una centrífuga Sigma 2-16PK. Se tomaron los sobrenadantes y sucesivamente se añadieron los compuestos (o DMSO). Se indujo el ensamblaje de actina mediante la adición de 5  $\mu\text{l}$  de tampón de polimerización de actina 10X (Cytoskeleton) (0.25X resistencia final) y se midió la emisión de fluorescencia de las muestras cada minuto hasta un total de 40 minutos, como se ha descrito anteriormente.

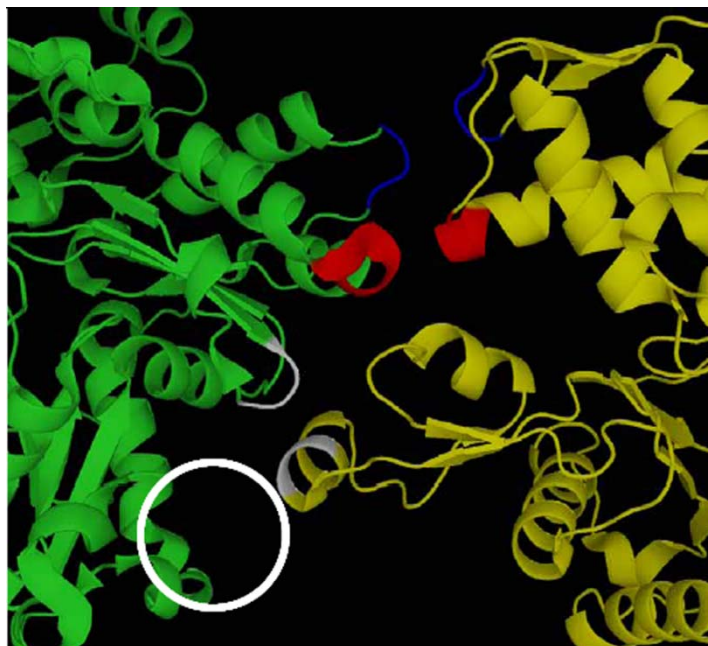
Un agente promotor del ensamblaje de actina producirá un incremento de fluorescencia mucho más notorio con respecto al que refleja la muestra control (DMSO) (Kouyama and Mihashi, 1981).

## **9.2. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a la actina.**

El estudio de la conformación de los compuestos **42**, **43**, **44** y **45** unidos a la actina se realizó por el Dr. Oriol Pineda en el marco de nuestra colaboración con el grupo del Profesor Villarasa, de la Universidad de Barcelona, tal y como se describe en Trigili et al., 2011.

La figura 20 muestra las interacciones entre dos monómeros de G-actina, así como el sitio de unión de los inhibidores de la proteína.





**Figura 20.** Interacciones esenciales entre dos unidades de G-actina para su agregación en F-actina (mostrado en azul, rojo y blanco). El sitio de unión de la citocalasina D (y otros inhibidores de la F-actina) se destaca por un círculo. Las citocalasinas bloquean las interacciones entre los aminoácidos de actina, impidiendo la formación de F-actina.

Las simulaciones de *docking* se llevaron a cabo mediante el programa AutoDock 3.05.

## **Resultados**



Las distintas moléculas empleadas a lo largo del presente trabajo (ver apartado correspondiente en Materiales y métodos) se seleccionaron tomando como referencias iniciales estructuras de productos que exhibieron o se suponía que mostrasen la propiedad biológica de interaccionar con componentes del citoesqueleto celular previamente mencionados.

De forma esquemática se resumen las familias de compuestos objeto de estudio, divididos en tres grupos diferentes según su mecanismo de acción (Tabla 4).

<p><b><u>Estabilizantes de microtúbulos:</u></b></p> <p>1. Familia de dictiostatina y discodermolida.</p> <p>2. Familia de pelorusido A.</p>
<p><b><u>Desestabilizantes de microtúbulos:</u></b></p> <p>3. Familia de pironetina.</p> <p>4. Familia de podofilotoxina.</p>
<p><b><u>Agentes que interaccionan con filamentos de actina:</u></b></p> <p>5. Familia de amfidinolidas.</p>

**Tabla 4.** Familias de compuestos empleados a lo largo del presente trabajo, clasificados según su mecanismo de acción.

El principal enfoque de la presente tesis fue la caracterización del modo de acción de los ligandos de la familia de dictiostatina y discodermolida. Los demás grupos de compuestos se estudiaron substancialmente a nivel celular, mientras que el estudio molecular y computacional se realizó en nuestro laboratorio y en colaboración con otros grupos de investigación.

## **Caracterización de la interacción de compuestos estabilizantes con tubulina y microtúbulos.**

### **1. Familia de dictiostatina y discodermolida.**

#### **1.1. Caracterización físico-química de los compuestos.**

##### **1.1.1. Caracterización química.**

La discodermolida y la dictiostatina son un grupo de compuestos que se conoce que se unen a tubulina induciendo su polimerización. Trabajos previos sugieren que tienen efecto sinérgico con paclitaxel y que son eficaces en células tumorales resistentes a quimioterapia (Giannakakou and Fojo, 2000; Honore et al., 2004; Martello et al., 2000, Buey et al., 2005). Además dada su alta solubilidad acuosa pueden emplearse para intentar detectar la previamente postulada unión de los agentes moduladores de microtúbulos a la tubulina dimérica y así obtener información adicional sobre los mecanismos de activación de tubulina por ligandos.

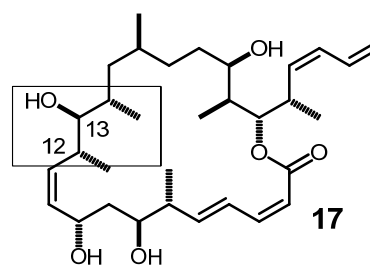
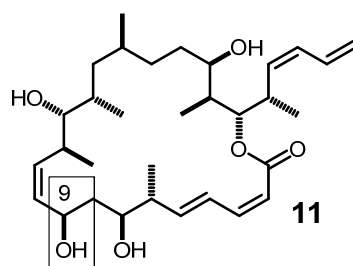
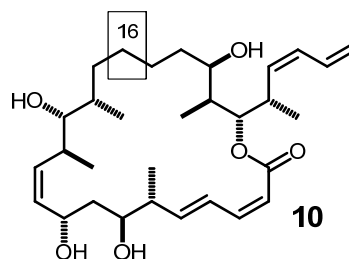
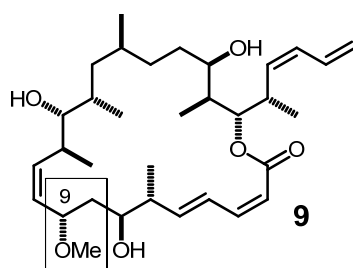
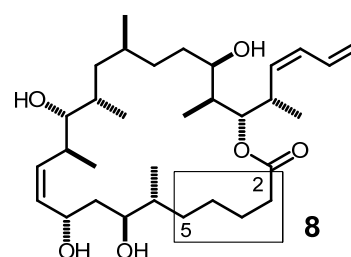
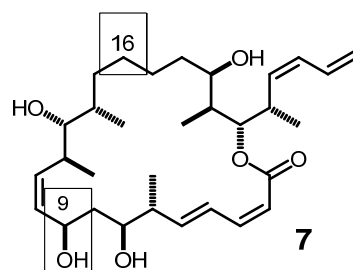
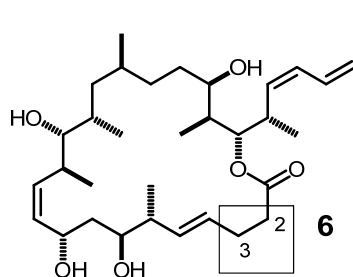
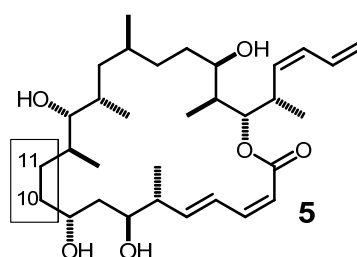
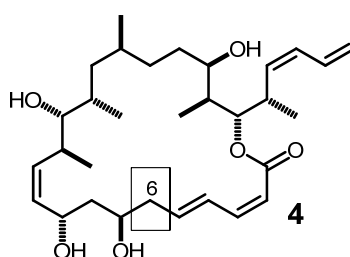
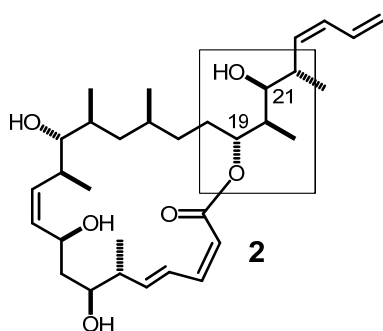
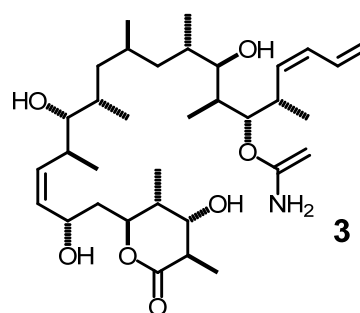
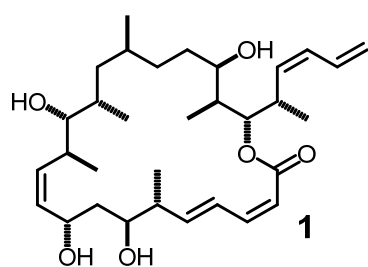
Para ello, nos planteamos comprobar el efecto sinérgico de estos compuestos, establecer su relación estructura-función de modo que podamos conocer los determinantes estructurales que resultan en mejor afinidad y efectos celulares. Asimismo deseamos comprobar su efecto en células resistentes a quimioterapia por todos los mecanismos conocidos: MDR,  $\beta$ -III y mutaciones, de modo que podamos estudiar las posibilidades farmacológicas del quimiotipo. Por último deseamos conocer las bases estructurales del efecto sinérgico, de la relación estructura-función y del efecto en células resistentes.

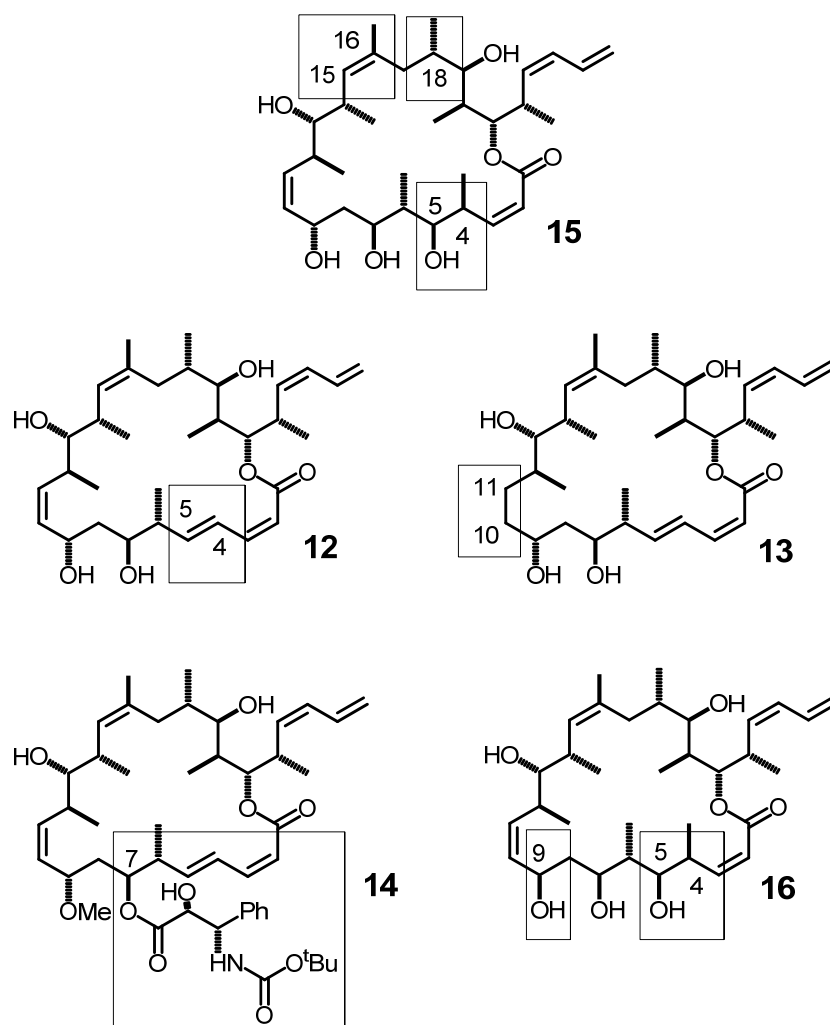
Para la realización del presente trabajo, contamos con dictiostatina (**1**) y discodermolida (**3**), diez dictiostatinas modificadas (**2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 17**) y cinco híbridos discodermolida/dictiostatina (**12, 13, 14, 15 y 16**).

La figura 21 muestra las estructuras de este grupo de moléculas, y cuya descripción química se recoge en la tabla 5.

# Dictiostatina

# Discodermolida





**Figura 21.** Estructuras químicas de dictiostatina (**1**) y discodermolida (**3**), análogos de dictiostatina (**2**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **10**, **11** y **17**) y híbridos discodermolida/dictiostatina (**12**, **13**, **14**, **15** y **16**). Se resaltan las distintas modificaciones estructurales.

**A**

Compuesto	Análogos de dictiostatina
<b>2</b>	Cambio del grupo funcional éster de la posición C21 a la C19.
<b>4</b>	Eliminación del metilo en posición C6.
<b>5</b>	Hidrogenación del doble enlace en posición C10-C11.
<b>6</b>	Hidrogenación del doble enlace en posición C2-C3.
<b>7</b>	Cambio en la estereoquímica del enlace en posición C9 y eliminación del metilo en posición C16.
<b>8</b>	Hidrogenación de dos dobles enlaces conjugados en posición C2-C3 y C4-C5.
<b>9</b>	Sustitución de un -OH por un -OMe en posición C9.
<b>10</b>	Eliminación del metilo en posición C16.
<b>11</b>	Cambio en la estereoquímica del enlace en posición C9.
<b>17</b>	Cambio en la estereoquímica del enlace en posición C12 y C13.

**B**

Compuesto	Híbridos discodermolida/dictiostatina
<b>15</b>	Híbrido entre discodermolida y dictiostatina de referencia.
<b>12</b>	Adición de un doble enlace en posición C4-C5.
<b>13</b>	Hidrogenación de un doble enlace en posición C10-C11.
<b>14</b>	Sustitución de un -OH por un -OMe en posición C9 y esterificación del hidroxilo en posición C7.
<b>16</b>	Cambio en la estereoquímica del enlace -OH en posición C9.

**Tabla 5.** Descripción de las modificaciones químicas de los ligandos estudiados. **A:** Análogos de dictiostatina. **B:** Híbridos discodermolida/dictiostatina.



### **1.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y caracterización espectrofotométrica en el ultravioleta-visible.**

En primer lugar, con el fin de detectar los compuestos en examen y obtener los parámetros espectroscópicos necesarios para el estudio de la interacción de los ligandos objeto de estudio con la tubulina, se realizaron ensayos de cromatografía líquida de alta resolución.

La detección de los compuestos por HPLC se realizó en un cromatógrafo Agilent 1100 empleando una columna de fase reversa C18, gradiente de acetonitrilo en agua del 30 al 100 % durante 30 minutos y 1 ml/min de flujo.

Los tiempos de retención determinados para los agentes de la familia de dictiostatina y discodermolida, en las condiciones experimentales descritas, se muestran en la tabla 6.

Compuesto	Tiempo de retención (min.)
1	15.852
2	17.396
3	10.297
4	16.147
5	17.046
6	18.851
7	14.930
8	18.791
9	20.038
10	15.443
11	16.002
12	16.399
13	17.230
14	23.653
15	16.601
16	18.655
17	16.867

**Tabla 6.** Tiempos de retención de los compuestos estudiados, obtenidos empleando una columna de fase reversa C18, un gradiente de acetonitrilo en agua del 30 al 100 % durante 30 minutos y 1ml/min de flujo, a temperatura ambiente.

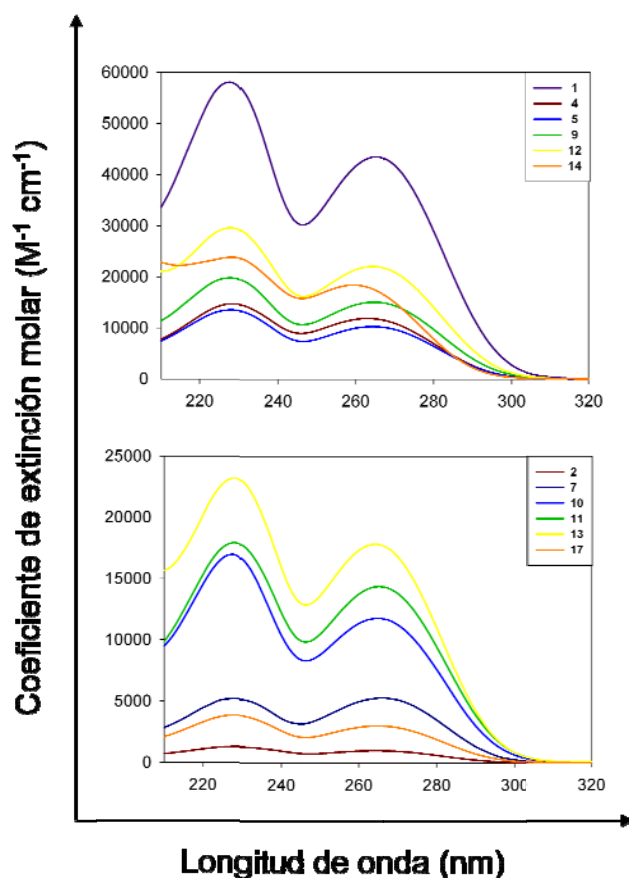
Posteriormente, la caracterización de los ligandos se completó midiendo sus espectros de absorción en la zona del ultravioleta-visible, tal y como se ha descrito en Materiales y métodos.

Los espectros obtenidos pueden ser consultados en las figuras 22 y 23, mientras que sus máximos de absorción y sus coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) se detallan en la tabla 7.

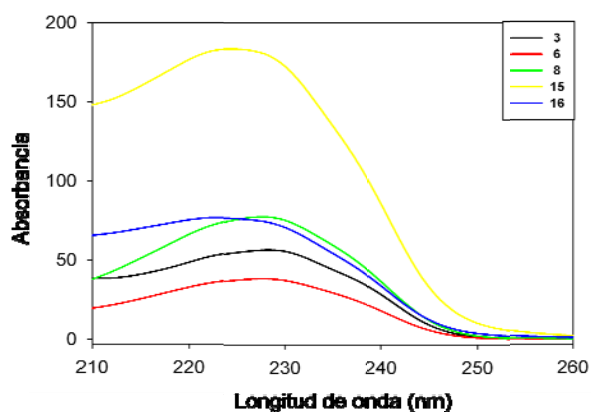
El resultado del ensayo empleado mostró que todos los compuestos presentaron bandas de absorción en la zona del ultravioleta. La mayoría de ellos (1, 2, 4, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 17) exhibió dos máximos de absorción a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 230 y 260 nm, proveniente de la transición  $\pi$  de

los dobles enlaces conjugados. Al contrario, los ligandos que absorbieron muy poco (**3**, **6**, **8**, **15** y **16**) presentaron un máximo solo a 230 nm debido a la falta del doble enlace en la posición C2-C3, cuya presencia determinó el pico de absorción de los otros compuestos a 260 nm. Este hecho es debido a que cada doble o triple enlace adicional en el sistema conjugado de electrones cambia el máximo de absorción hacia un valor más alto.

Por falta de compuesto sólido suficiente no fue posible determinar el coeficiente de extinción molar para los ligandos **3**, **6**, **8**, **15** y **16**.



**Figura 22.** Espectros de absorción en el ultravioleta-visible de los compuestos de la familia de dictiostatina y discodermolida. Se muestra el espectro de absorción promediado de un total de tres medidas independientes realizadas en metanol grado espectroscopia y a 25 °C.



**Figura 23.** Espectros de absorción en el ultravioleta-visible de los compuestos de la familia de dictiostatina y discodermolida que absorben poco. Se muestra el espectro de absorción promediado de un total de tres medidas independientes realizadas en metanol grado espectroscopia y a 25 °C.

Compuestos	Coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) ( $M^{-1} cm^{-1}$ )
1	$\epsilon_{228nm} = 50743 \pm 2730$ $\epsilon_{265nm} = 39799 \pm 1623$
2	$\epsilon_{228nm} = 1297 \pm 245$ $\epsilon_{265nm} = 1006 \pm 123$
3	s.d.
4	$\epsilon_{228nm} = 13297 \pm 2202$ $\epsilon_{264nm} = 10734 \pm 960$
5	$\epsilon_{228nm} = 11846 \pm 1218$ $\epsilon_{265nm} = 9100 \pm 1170$
6	s.d.
7	$\epsilon_{228nm} = 5241 \pm 328$ $\epsilon_{264nm} = 5330 \pm 298$
8	s.d.
9	$\epsilon_{228nm} = 17424 \pm 2333$ $\epsilon_{264nm} = 13282 \pm 1282$
10	$\epsilon_{228nm} = 14366 \pm 1366$ $\epsilon_{264nm} = 9989 \pm 853$
11	$\epsilon_{228nm} = 17931 \pm 1285$ $\epsilon_{265nm} = 14376 \pm 1386$
12	$\epsilon_{228nm} = 28825 \pm 1532$ $\epsilon_{264nm} = 19280 \pm 893$
13	$\epsilon_{228nm} = 20516 \pm 3379$ $\epsilon_{264nm} = 15767 \pm 3292$
14	$\epsilon_{228nm} = 21027 \pm 2397$ $\epsilon_{260nm} = 16155 \pm 1319$
15	s.d.
16	s.d.
17	$\epsilon_{228nm} = 3858 \pm 179$ $\epsilon_{264nm} = 3028 \pm 157$

**Tabla 7.** Coeficientes de extinción molar de los compuestos objeto de estudio. Se muestra el valor promedio y la desviación estándar de un total de tres medidas independientes.

## 1.2. Efectos de los ligandos en células.

### 1.2.1. Citotoxicidad.

Con el fin de estudiar la actividad biológica de los ligandos y comprobar su efecto citotóxico en distintas líneas celulares, se realizaron ensayos para determinar sus CI<sub>50</sub>, en comparación con las moléculas de referencia (**1** y **3**) y el paclitaxel.

Para ello, se emplearon, inicialmente, células humanas de carcinoma de ovario sensibles (A2780) y multirresistentes a fármacos por sobreexpresión de la glicoproteína-P (A2780AD).

Las CI<sub>50</sub> de cada uno de los compuestos se muestran en la tabla 8.

En las células A2780, el compuesto más citotóxico resultó ser el ligando **1** (CI<sub>50</sub> 2.5 nM), que presentó una citotoxicidad similar a la del compuesto **12** (CI<sub>50</sub> 1.9 nM), aunque ambos fueron ligeramente menos activos que el paclitaxel (CI<sub>50</sub> 1.8 nM). Los ligandos **4** (CI<sub>50</sub> 3.6 nM), **5** (CI<sub>50</sub> 5.5 nM) y **9** (CI<sub>50</sub> 4.9 nM) mostraron citotoxicidades muy similares entre sí y algo más bajas que los compuestos anteriores. La actividad de los ligandos **3** (CI<sub>50</sub> 28 nM), **6** (CI<sub>50</sub> 33.3 nM), **8** (CI<sub>50</sub> 30.6 nM), **10** (CI<sub>50</sub> 42.9 nM), **11** (CI<sub>50</sub> 66.6 nM), **13** (CI<sub>50</sub> 69 nM), **14** (CI<sub>50</sub> 101.5 nM) se reveló bastante más baja y, juntos a los compuestos **2** (CI<sub>50</sub> 1203 nM), **7** (CI<sub>50</sub> 7000 nM), **15** (CI<sub>50</sub> 488 nM) y **16** (CI<sub>50</sub> 2933 nM), dichos ligandos exhibieron citotoxicidades entre uno y tres órdenes de magnitud menores que el paclitaxel. El ligando menos citotóxico resultó ser el compuesto **17** (CI<sub>50</sub> >20000), cuya citotoxicidad no fue posible determinar con precisión por falta de cantidad de muestra.

Frente a las células A2780AD se confirmó la resistencia de la línea celular empleada en presencia del paclitaxel (CI<sub>50</sub> 1491 nM) previamente observada en la literatura (Matesanz et al., 2008). Por el contrario, los compuestos de la familia de dictiostatina y discodermolida, manteniendo, también en este caso, las mismas relaciones que en las células A2780, mostraron un efecto citotóxico mucho mayor que el paclitaxel. El compuesto más activo fue el híbrido **12** (CI<sub>50</sub> 0.9 nM). El menos activo el análogo **17** (CI<sub>50</sub> >20000), cuya citotoxicidad, como se ha mencionado previamente, no fue posible determinar con precisión.

El índice de resistencia mostrado (obtenido mediante el cociente de la CI<sub>50</sub> del ligando en la línea resistente entre la de la línea sensible: R/S) es indicativo del efecto del compuesto en las células resistentes.

Se observó que los índices de resistencia para la pareja de células A2780AD/A2780 en presencia de los ligandos de la familia objeto de estudio disminuyeron en comparación con el paclitaxel (R/S 828.2), hasta el punto de llegar prácticamente a vencer la resistencia a fármacos que confiere la gp-P. Entre estos, los valores más significativos se observaron en presencia de los compuestos **1** (R/S 1.5), **3** (R/S 1.35), **4** (R/S 1.4), **5** (R/S 0.85), **6** (R/S 0.5), **8** (R/S 0.6), **9** (R/S 1.4) y **12** (R/S 0.5).

Compuesto	A2780 (nM)	A2780AD (nM)	R/S
<b>Paclitaxel</b>	1.8 ± 0.4	1491 ± 284	828.2
<b>1</b>	2.5 ± 1	3.9 ± 0.2	1.5
<b>2</b>	1203 ± 52	1423 ± 39	1.2
<b>3</b>	28 ± 3	37.9 ± 5.2	1.35
<b>4</b>	3.6 ± 1.5	5.1 ± 0.85	1.4
<b>5</b>	5.5 ± 1.2	4.7 ± 1.6	0.85
<b>6</b>	33.3 ± 11.6	16 ± 0.7	0.5
<b>7</b>	7000 ± 300	8575 ± 125	1.2
<b>8</b>	30.6 ± 8.2	17.6 ± 0.45	0.6
<b>9</b>	4.9 ± 0.8	6.9 ± 0.4	1.4
<b>10</b>	42.9 ± 4.7	94.4 ± 2.7	2.2
<b>11</b>	66.6 ± 8.9	260 ± 43	3.9
<b>12</b>	1.9 ± 0.9	0.9 ± 0.1	0.5
<b>13</b>	69 ± 1.7	413.5 ± 21.6	6
<b>14</b>	101.5 ± 3.95	89.3 ± 3.9	0.9
<b>15</b>	488 ± 35	551.5 ± 53.3	1.1
<b>16</b>	2933 ± 219	4733 ± 437	1.6
<b>17</b>	>20000	>20000	-

**Tabla 8.** Citotoxicidad de los ligandos de la familia de dictioestatina y discodermolida en células de carcinoma de ovario sensibles (A2780) y multirresistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P (A2780AD) incubadas durante 48 horas. Los datos representan la media (± errores

estándar) de al menos cuatro experimentos diferentes. R/S representa el índice de resistencia de la línea A2780AD, obtenido dividiendo la CI50 de la línea resistente por la CI50 de la línea sensible.

Posteriormente, se evaluó el efecto citotóxico de los ligandos en la pareja de células humanas de carcinoma de cérvix sensibles (Hela S3) y resistentes a paclitaxel por sobreexpresión del isotipo  $\beta$ -III de tubulina humana (Hela transfectada- $\beta$ -III), en comparación con el paclitaxel y las moléculas **1** y **3**.

Las CI50 de cada uno de los compuestos se muestran en la tabla 9.

En las células Hela S3, el compuesto más citotóxico resultó ser el ligando **12** (CI50 0.5 nM), que presentó una citotoxicidad similar a la del paclitaxel (CI50 0.8 nM). Los ligandos **1** (CI50 1.5 nM), **3** (CI50 6 nM), **4** (CI50 3.5 nM) y **9** (CI50 1.9 nM) presentaron un efecto citotóxico muy elevado y citotoxicidades muy similares entre sí, aunque entre 2 y 8 veces superiores que los compuestos anteriores. Los ligandos **5** (CI50 9.7 nM), **6** (CI50 13 nM), **8** (CI50 16.7 nM), **10** (CI50 18.3 nM), **11** (CI50 25.8 nM), **13** (CI50 32.6 nM) y **14** (CI50 34 nM) siguieron mostrando una actividad muy elevada en el rango nM, mientras que los agentes **2** (CI50 1050 nM), **7** (CI50 2627.5 nM), **15** (CI50 719 nM), **16** (CI50 2360 nM) y **17** (CI50 24250 nM) exhibieron citotoxicidades entre dos y tres órdenes de magnitud menores que el paclitaxel.

De igual manera a lo que se ha observado en las células A2780AD, los ligandos de la familia de dictiostatina y discodermolida fueron capaces de vencer la presencia del fenotipo de resistencia a paclitaxel debido a la sobreexpresión del isotipo  $\beta$ -III de tubulina en las células Hela transfectada- $\beta$ -III.

Se observó que los índices de resistencia para la pareja de células Hela transfectada- $\beta$ -III/Hela S3 disminuyeron en presencia de los ligandos objeto de estudio con respecto a aquél del paclitaxel (R/S 10.75) y, en muchos casos, frente a los de las moléculas parentales. Los valores más bajos se obtuvieron en presencia de los ligandos **6** (R/S 1.4), **8** (R/S 0.9), **10** (R/S 1.15), **11** (R/S 1.2), **13** (R/S 0.95) y **14** (R/S 1.9).



Compuesto	Hela S3 (nM)	Hela transfecteda- $\beta$ -III (nM)	R/S
<b>Paclitaxel</b>	$0.8 \pm 0.2$	$8.6 \pm 1.4$	10.75
<b>1</b>	$1.5 \pm 0.3$	$4.4 \pm 0.8$	2.9
<b>2</b>	$1050 \pm 145$	$1160 \pm 115.2$	1.1
<b>3</b>	$6 \pm 0.8$	$13.2 \pm 1.25$	2.2
<b>4</b>	$3.5 \pm 0.7$	$10.2 \pm 1.5$	2.95
<b>5</b>	$9.7 \pm 1.9$	$35 \pm 2$	3.6
<b>6</b>	$13 \pm 3$	$18.5 \pm 1.1$	1.4
<b>7</b>	$2627.5 \pm 182$	$7275 \pm 625$	2.8
<b>8</b>	$16.7 \pm 3.2$	$15.3 \pm 1.4$	0.9
<b>9</b>	$1.9 \pm 0.1$	$6.1 \pm 0.8$	3.2
<b>10</b>	$18.3 \pm 1.9$	$21 \pm 1.5$	1.15
<b>11</b>	$25.8 \pm 1.3$	$31.3 \pm 4$	1.2
<b>12</b>	$0.5 \pm 0.02$	$1.8 \pm 0.2$	3.6
<b>13</b>	$32.6 \pm 4.65$	$31.2 \pm 6.5$	0.95
<b>14</b>	$34 \pm 3$	$67 \pm 5.4$	1.9
<b>15</b>	$719 \pm 39$	$1047.5 \pm 120$	1.45
<b>16</b>	$2360 \pm 133$	$1450 \pm 104.1$	0.6
<b>17</b>	$24250 \pm 250$	$9150 \pm 312.2$	0.4

**Tabla 9.** Citotoxicidad de los ligandos de la familia de dictioistatina y discodermolida en células de carcinoma de cérvix sensibles (Hela S3) y resistentes a paclitaxel por sobreexpresión del isotipo  $\beta$ -III de tubulina (Hela transfecteda- $\beta$ -III) incubadas durante 72 horas. Los datos representan la media ( $\pm$  errores estándar) de al menos cuatro experimentos diferentes. R/S representa el índice de resistencia de la línea Hela transfecteda- $\beta$ -III, obtenido dividiendo la CI50 de la línea resistente por la CI50 de la línea sensible.

De igual manera a los antes mencionados, la batería de compuestos estudiados fue probada frente a otra línea celular procedente de carcinoma de ovario (un clon de la A2780), la 1A9 y a tres mutantes derivados de ésta, que presentan mutaciones en  $\beta$  tubulina que les confieren resistencia a paclitaxel (las dos primeras) y a epotilona A (la última): las líneas PTX10, PTX22 y A8.

Las CI50 de cada uno de los compuestos se muestran en la tabla 10.

En las células 1A9, siendo un clon de las células A2780, se mantuvieron los mismos resultados que los mostrados en la tabla 8. En las condiciones experimentales ensayadas, el compuesto más citotóxico resultó ser el ligando **12** (CI50 1.2 nM), que presentó una citotoxicidad similar a la del paclitaxel (CI50 2.2 nM). Los ligandos **1** (CI50 7.7 nM), **4** (CI50 8.7 nM), **5** (CI50 6.8 nM) y **9** (CI50 5.4 nM) mostraron citotoxicidades muy similares entre sí y ligeramente más bajas que el paclitaxel (entre 2 y 4 veces). Al contrario, la actividad de los ligandos **3** (CI50 40 nM), **6** (CI50 25 nM), **8** (CI50 25.5 nM), **10** (CI50 26 nM), **11** (CI50 18.15 nM), **13** (CI50 51 nM) y **14** (CI50 125 nM) se reveló bastante más baja y, juntos a los compuestos **2** (CI50 1457 nM), **7** (CI50 7967 nM), **15** (CI50 566 nM) y **16** (CI50 2583 nM), dichos ligandos exhibieron citotoxicidades entre uno y tres órdenes de magnitud menores que el paclitaxel. El ligando menos citotóxico resultó ser el compuesto **17** (CI50 >40000), cuya citotoxicidad, como se ha mencionado anteriormente, no fue posible determinar con precisión por falta de cantidad de muestra.

De forma muy parecida a lo que se observó en las células A2780AD, la resistencia a fármacos resultó minimizada en las tres líneas resistentes PTX10, PTX22 y A8 en presencia de todos los compuestos estudiados. En particular, en las líneas PTX22 y A8 todos los ligandos se comportaron de forma muy parecida a la de sus moléculas de referencia. En la línea PTX10 la mayoría de los compuestos venció el fenómeno de la resistencia, aunque en algunos casos el índice R/S no se pudo medir por falta de muestra más concentrada. Los resultados mejores se obtuvieron en presencia de las moléculas parentales **1** (R/S 1.1) y **3** (R/S 0.6).

En la línea PTX22 prácticamente todos los compuestos vencieron la resistencia por mutación en  $\beta$  tubulina, observada en presencia del paclitaxel. Los ligandos más activo fueron los compuestos **1** (R/S 0.7), **3** (R/S 1.3), **4** (R/S 1.5), **9** (R/S 1.5) y **10** (R/S 1.4).

En las células A8 (resistente a epotilona) la mayoría de los compuestos mostró un efecto citotóxico muy elevado, y como consecuencia vencieron el fenómeno de resistencia. Los ligandos más activos fueron el **1** (CI50 1.5 nM) y el **12** (CI50 1.8 nM).

Los índices de resistencia mostraron valores muy parecidos a los de paclitaxel en la línea celular ensayada. Los resultados mejores se obtuvieron en presencia de los ligandos **1** (R/S 0.2), **3** (R/S 0.5), **4** (R/S 1.1), **6** (R/S 1.3), **8** (R/S 1.4), **9** (R/S 0.7), **12** (R/S 1.5) y **14** (R/S 1.1).

Compuesto	1A9 (nM)	PTX10 (nM)	R/S	PTX22 (nM)	R/S	A8 (nM)	R/S
<b>Paclitaxel</b>							
<b>1</b>	2.2 ± 0.7	81.35 ± 6	37	33 ± 1.95	14.9	3.7 ± 0.3	1.7
<b>2</b>	7.7 ± 0.2	8.5 ± 2.5	1.1	5.7 ± 1.8	0.7	1.5 ± 0.65	0.2
<b>3</b>	1457 ± 182	1932 ± 201	1.3	2067 ± 592.5	1.4	1417 ± 142	1
<b>4</b>	40 ± 2	23.3 ± 2.1	0.6	51 ± 6.5	1.3	21 ± 1.4	0.5
<b>5</b>	8.7 ± 2.8	25 ± 3.6	2.9	13 ± 2.7	1.5	9.9 ± 0.4	1.1
<b>6</b>	6.8 ± 2	207 ± 54	30.5	21.15 ± 1.1	3.1	15.4 ± 2.2	2.3
<b>7</b>	25 ± 5	137 ± 12.35	5.4	80.35 ± 3.6	3.2	33.7 ± 2.8	1.3
<b>8</b>	7967 ± 338	≥30000	-	11050 ± 1333	1.4	8250 ± 328	1.03
<b>9</b>	25.5 ± 5.1	692 ± 4.8	27.15	42.5 ± 8.2	1.7	37.2 ± 1.9	1.4
<b>10</b>	5.4 ± 1.35	14.7 ± 1.7	2.7	8.1 ± 1.35	1.5	4.1 ± 0.3	0.7
<b>11</b>	26 ± 4.5	>5000	-	38 ± 11	1.4	81 ± 5	3.1
<b>12</b>	18.15 ± 0.05	6687.5 ± 1010	368.4	78.5 ± 15.7	4.3	128.5 ± 5.2	7.1
<b>13</b>	1.2 ± 0.4	5.65 ± 1.4	4.7	3.3 ± 0.4	2.75	1.8 ± 0.2	1.5
<b>14</b>	51 ± 8.4	>5000	-	166 ± 8.6	3.3	104 ± 3.4	2
<b>15</b>	125 ± 13	7537.5 ± 856.2	60.15	643 ± 48.4	5.1	143 ± 7.3	1.1
<b>16</b>	566 ± 105	>5000	-	591.5 ± 84.35	1.04	314 ± 18.2	0.55
<b>17</b>	2583 ± 117	16167 ± 5068	6.2	4250 ± 50	1.6	4030 ± 541	1.6
	≥40000	≥40000	-	≥40000	-	≥40000	-

**Tabla 10.** Citotoxicidad de los ligandos de la familia de dictiostatina y discodermolida en células de carcinoma de ovario sensibles (1A9) y resistentes a paclitaxel (PTX10, PTX22) y a epotilona A (A8) por mutaciones en  $\beta$  tubulina incubadas durante 48 horas. Los datos representan la media ( $\pm$  errores estándar) de al menos cuatro experimentos diferentes. Cada R/S representa

el índice de resistencia de las líneas mutadas, obtenido dividiendo la CI50 de cada línea resistente (PTX10, PTX22, A8) por la CI50 de la línea sensible.

Se pudo concluir que, en las condiciones experimentales utilizadas y en presencia de las líneas celulares sensibles (A2780, Hela S3 y 1A9), la mayoría de los ligandos presentó un efecto citotóxico elevado. Por el contrario, otros compuestos ensayados fueron menos activos y mostraron actividad en un rango superior ( $\mu\text{M}$ ).

El efecto citotóxico de los compuestos de la familia de dictiostatina y discodermolida se confirmó en las líneas celulares con fenotipo de resistencia (A2780AD, Hela trasfectada- $\beta$ -III, PTX10, PTX22 y A8) en la mayoría de los casos, venciendo el fenómeno de resistencia a paclitaxel por distintos mecanismos.

#### **1.2.1.1. Sinergia y análisis estadístico.**

A pesar de que muchos de los compuestos descritos en el apartado Introducción han tenido un éxito clínico como agentes de tratamiento único, su uso en combinación con otros agentes antitumorales se encuentra bajo intensas evaluaciones, particularmente para el tratamiento de cánceres avanzados o recurrentes, refractarios a la quimioterapia estándar (Goldspiel, 1997). El desarrollo de resistencia clínica a los medicamentos utilizados ha puesto de relieve la necesidad de nuevos fármacos quimioterapéuticos y combinaciones sinérgicas entre estos agentes.

Clásicamente, la sinergia se define como la adición de efectos terapéuticos en comparación con la eficacia de cada fármaco utilizado individualmente. La combinación de dos fármacos que actúan de forma sinérgica permitiría el tratamiento con dosis más bajas de cada compuesto ofreciendo, en cambio, mayores efectos a concentraciones reducidas.

Un problema importante de un fármaco insoluble en agua, como el paclitaxel, es la dificultad de suministrar los altos niveles plasmáticos necesarios para obtener un efecto sobre las células cancerosas. La

combinación del paclitaxel con un fármaco más soluble podría superar dicho obstáculo.

Desde hace unos años se están probando muchas terapias de combinación de medicamentos con mecanismos de acción diferentes, con la idea de que la focalización de dos vías independientes dé lugar a un aumento de la citotoxicidad, sea esta aditiva o sinérgica (Amadori et al., 1996; Klaassen et al., 1998; Felip et al., 1998; McDaid and Johnston, 1999). Sin embargo, no hay que descartar el uso combinado de agentes con mecanismos de acción o dianas moleculares similares (Tortoriello et al., 1998; Keren-Rosenberg and Muggia, 1997; Hudes et al., 1997).

Estudios previos demostraron efectos sinérgicos, en cultivos celulares (Honore et al., 2004; Martello et al., 2000) y en animales (Huang et al., 2006), entre dos agentes que se unen al sitio del paclitaxel (paclitaxel y discodermolida). Evidencias más recientes indicaron que la discodermolida no se une a los mismos residuos peptídicos dentro del sitio de paclitaxel (Khrapunovich-Baine et al., 2009) y que la cinética de polimerización de los dos fármacos difiere uno de otro (Gertsch et al., 2009). Datos preliminares de cristalografía revelados por nuestro grupo (aún no publicados y mostrados más adelante) demostraron que los agentes estabilizantes de microtúbulos ocupan una zona diferente del clásico sitio de paclitaxel. Como consecuencia, este hecho podría apoyar algunas de las acciones sinérgicas observadas en presencia de combinaciones de medicamentos particulares.

Sin embargo, es posible que dos fármacos actúen sinérgicamente sobre un objetivo y antagónica o aditivamente en otro. Por tanto, la naturaleza y las causas de las interacciones sinérgicas en la terapia de drogas son complejas y merecen una investigación adicional.

Una vez comprobada la actividad citotóxica de los compuestos de la familia de dictiostatina y discodermolida, y basándonos en los resultados descritos en literatura, se pensó estudiar su efecto junto con el de distintos agentes estabilizantes de microtúbulos (paclitaxel, pelorusido A y epotilona A), con el fin de identificar posibles efectos sinérgicos y destacar la importancia de estos tipos de ensayos en estudios preclínicos.

Para ello, se emplearon células humanas de carcinoma de ovario A2780 incubadas durante 48 horas en presencia de distintas combinaciones de drogas (Tabla 11) tal y como se ha detallado en Materiales y métodos.

Las combinaciones entre el paclitaxel y los compuestos de la familia de dictiostatina y discodermolida probados mostraron valores sinérgicos bastante claros, excepto aquéllas entre el paclitaxel y el ligando **10** (IC 1.3 nM, efecto antagonista) y entre el paclitaxel y el ligando **12**, cuyo resultado del P valor supera 0.05 y, por tanto, no puede considerarse significativo (véase Materiales y métodos).

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se confirmó la sinergia entre el paclitaxel y la discodermolida (**3**) observada en estudios previos (Giannakakou and Fojo, 2000; Honore et al., 2004; Martello et al., 2000), así como aquélla observada entre paclitaxel y epotilona A (aunque se unan al mismo sitio en los microtúbulos), descartando la combinación de concentraciones más altas.

A diferencia de lo que se encontró unos años atrás (Wilmes et al., 2007), en las combinaciones ensayadas no se evidenció ninguna sinergia entre el pelorusido A y la epotilona A.

Las uniones entre el pelorusido A y los ligandos seleccionados de la familia en examen mostraron efectos sinérgicos solo en presencia de bajas concentraciones de compuestos (pelorusido A y ligando **1**, IC 0.6 nM; pelorusido A y ligando **3**, IC 0.4 nM y 0.7 nM; pelorusido A y ligando **5**, IC 0.7 nM). No se observó ninguna sinergia entre pelorusido A y ligando **12**.

<b>Paclitaxel (nM) + 1 (nM)</b>	<b>IC <math>\pm</math> error est.</b>	<b>n</b>	<b>P valor</b>
0.25 + 0.625	0.2 $\pm$ 0.1	3	0.0108
0.5 + 1	1.5 0.2	3	0.1525
0.5 + 1.25	0.7 $\pm$ 0.03	3	0.0099
0.5 + 1.875	0.7 $\pm$ 0.2	3	0.1997

<b>Paclitaxel (nM) + 3 (nM)</b>	<b>IC ± error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
0.25 + 10	0.5 ± 0.02	3	0.0015
0.5 + 10	0.4 ± 0.01	3	<0.0001
0.5 + 20	0.6 ± 0.01	2	0.017
<b>Paclitaxel (nM) + 4 (nM)</b>	<b>IC ± error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
0.5 + 1.4	0.3 ± 0.02	3	0.0007
0.5 + 2.8	0.5 ± 0.01	3	0.0004
<b>Paclitaxel (nM) + 5 (nM)</b>	<b>IC ± error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
0.25 + 1.375	0.2 ± 0.01	3	0.0002
0.5 + 1.375	0.3 ± 0.01	3	0.0002
0.25 + 2.75	0.6 ± 0.03	3	0.0082
0.5 + 2.75	0.8 ± 0.02	3	0.0099
<b>Paclitaxel (nM) + 9 (nM)</b>	<b>IC ± error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
0.5 + 2.475	0.5 ± 0.02	3	0.0042
<b>Paclitaxel (nM) + 10 (nM)</b>	<b>IC ± error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
0.5 + 22.5	1.3 ± 0.01	3	0.0004
<b>Paclitaxel (nM) + 12 (nM)</b>	<b>IC ± error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
0.25 + 1	0.4 ± 0.003	3	<0.0001
0.5 + 1	0.4 ± 0.2	2	0.0898
<b>Paclitaxel (nM) + Epotilona A (nM)</b>	<b>IC ± error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
0.25 + 1	0.3 ± 0.02	3	0.0187
0.5 + 1	0.3 ± 0.005	3	0.0043
0.25 + 2	0.4 ± 0.005	3	0.0053
0.25 + 3	0.7 ± 0.08	3	0.1972



<b>Pelorusido A (nM) + Epotilona A (nM)</b>	<b>IC <math>\pm</math> error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
4.5 + 1	0.8 $\pm$ 0.2	4	0.4886
9 + 1	0.7 $\pm$ 0.05	3	0.1257
9 + 2	0.9 $\pm$ 0.04	3	0.3100
13 + 1	1 $\pm$ 0.07	3	0.9097

<b>Pelorusido A (nM) + 1 (nM)</b>	<b>IC <math>\pm</math> error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
4.5 + 0.625	0.6 $\pm$ 0.07	3	0.0249
4.5 + 1.25	0.8 $\pm$ 0.06	2	s.d.
9 + 1.25	1.4 $\pm$ 0.3	3	0.4124
13 + 0.625	1.6 $\pm$ 0.4	3	0.3824

<b>Pelorusido A (nM) + 3 (nM)</b>	<b>IC <math>\pm</math> error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
4.5 + 7.5	0.4 $\pm$ 0.1	4	0.0191
4.5 + 15	0.7 $\pm$ 0.06	4	0.0274
9 + 15	1.2 $\pm$ 0.15	3	0.4097
13 + 10	1.9 $\pm$ 0.5	3	0.3228

<b>Pelorusido A (nM) + 5 (nM)</b>	<b>IC <math>\pm</math> error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
4.5 + 1.375	0.7 $\pm$ 0.1	4	0.0377
4.5 + 2.75	0.7 $\pm$ 0.1	3	0.2716
9 + 1.375	1.1 $\pm$ 0.35	3	0.7422
9 + 2.75	1.3 $\pm$ 0.4	3	0.5635

<b>Pelorusido A (nM) + 12 (nM)</b>	<b>IC <math>\pm</math> error est.</b>	<b><i>n</i></b>	<b>P valor</b>
4.5 + 0.5	0.6 $\pm$ 0.1	3	0.2578
9 + 0.5	1.3 $\pm$ 0.3	3	0.5844
9 + 1	1.7 $\pm$ 0.4	3	0.3228
13 + 0.5	1.9 $\pm$ 0.6	3	0.3990

**Tabla 11.** Valores calculados para el índice de combinación (IC) entre distintos agentes. Los P valores se calcularon utilizando el programa GraphPad Prism v4.0, indicando el número de repeticiones biológicas (*n*). Los valores de IC que muestran interacciones sinérgicas significativas se presentan en rojo.

Se concluyó que, en la mayoría de las combinaciones probadas, se obtuvo sinergia entre las distintas drogas testadas, principalmente empleando las concentraciones más bajas. Al aumentar dichas concentraciones, aunque en algunos casos los valores de IC fueron menores de 1 (véase Materiales y métodos), el cálculo estadístico descartó la posibilidad de considerar los efectos resultantes como sinérgicos.

### **1.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.**

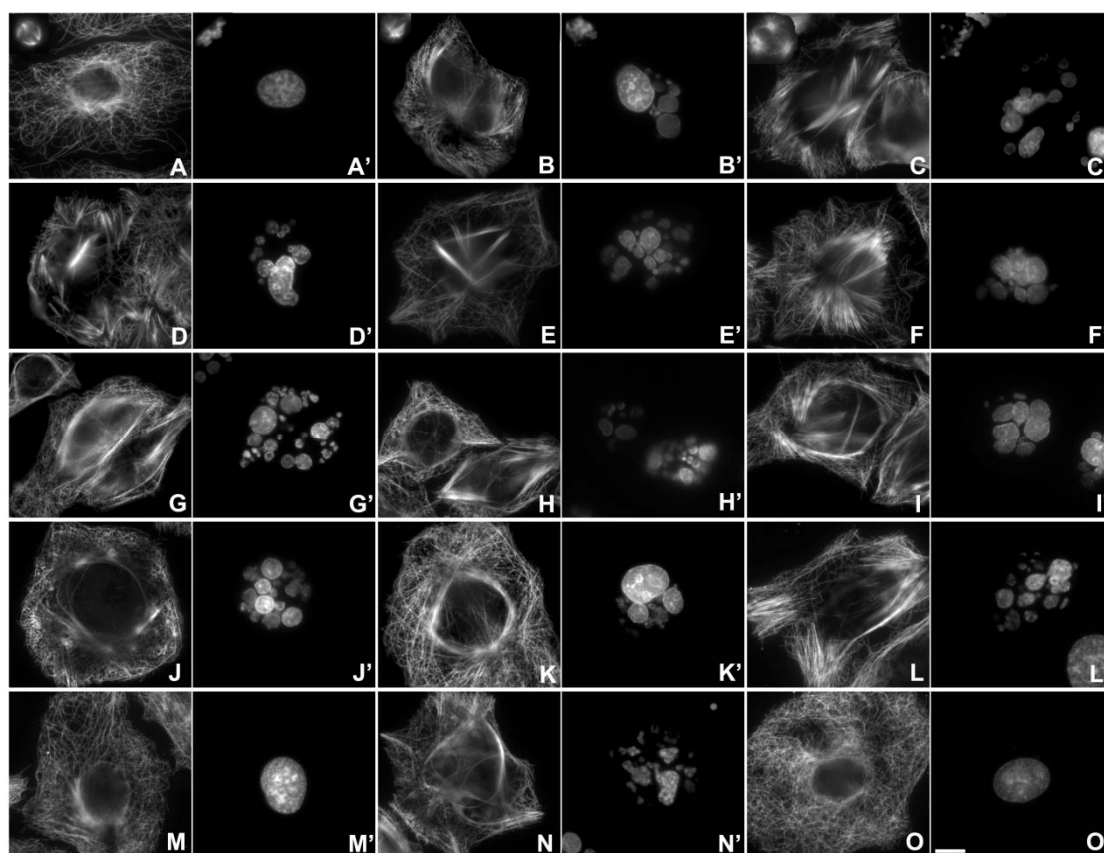
Con el fin de evaluar la actividad (estabilizante o desestabilizante) de los compuestos objeto de estudio a nivel del citoesqueleto, se decidió estudiar el efecto de dichos ligandos sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear, comparativamente a los agentes ya caracterizados **1** y **3** (Buey et al., 2005).

Para ello, se emplearon células humanas de carcinoma de pulmón A549 incubadas durante 24 horas en presencia de distintas concentraciones de ligando.

Las inmunofluorescencias (Figura 24) mostraron cómo los compuestos empleados indujeron de forma potente la aparición de haces anormales de microtúbulos, al igual que las moléculas parentales y el paclitaxel. La diferencia con el paclitaxel se evidenció en la distinta morfología de estos haces: largos y sutiles en el caso del taxano, cortos y más gruesos en las preparaciones de los compuestos estudiados. Aunque exhibiendo dichas diferencias, los microtúbulos de todas las células tratadas perdieron el movimiento característicos de las células no tratadas (DMSO).

Los compuestos **1** y **12** fueron especialmente potentes en la inducción de estos haces, así como los ligandos **3**, **6** y **9**, cuyo efecto se mostró a la misma concentración del paclitaxel (100 nM). Los compuestos ensayados menos activos fueron el **11**, **13**, **14** y **15**. Desafortunadamente, debido a las limitaciones de ligandos disponibles, no se pudo probar el resto de compuestos (**2**, **7**, **16** y **17**).

La presencia de los ligandos determinó además la aparición de un gran número de células micronucleadas, husos mitóticos multipolares y ásteres múltiples (Figura 24 inserto en C, representativo para todos los compuestos de la familia en examen). Por el contrario, en el control (DMSO) se observó un huso mitótico normal (Figura 24 inserto en A), mientras que en la mayor parte de la preparación del paclitaxel se distinguieron husos monopolares (Figura 24 inserto en B).



**Figura 24.** Efectos de los análogos (**4**, **5**, **6**, **8**, **9**, **10** y **11**) e híbridos (**12**, **13**, **14** y **15**) de la familia de dictioestatina y discodermolida en comparación con: células sin tratar (DMSO), tratadas con paclitaxel y en presencia de las moléculas de referencia (**1** y **3**) sobre la red de microtúbulos, los husos mitóticos y la morfología nuclear. Las células A549 se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSO (A, A'), paclitaxel 100 nM (B, B'), **1** 50 nM (C, C'), **3** 100 nM (D, D'), **4** 250 nM (E, E'), **5** 200 nM (F, F'), **6** 100 nM (G, G'), **8** 200 nM (H, H'), **9** 100 nM (I, I'), **10** 800 nM (J, J'), **11** 2  $\mu$ M (K, K'), **12** 60 nM (L, L'), **13** 1.8  $\mu$ M (M, M'), **14** 6  $\mu$ M (N, N') y **15** 8  $\mu$ M (O, O'). Los microtúbulos (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina, mientras que el ADN (A', B', C', D', E', F', G', H', I', J', K',

L', M', N', O') se marcó con Hoechst 33342. Las inserciones (A, A', B, B', C, C', estas últimas representativas para todo los ligandos en examen) muestran los husos mitóticos de las mismas preparaciones. La barra (O') representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento.

Así pues, estos resultados pusieron de manifiesto que los compuestos estudiados actúan, en las condiciones experimentales ensayadas, estabilizando los microtúbulos e induciendo el ensamblaje de dichos polímeros a nivel celular, de la misma manera que las moléculas parentales.

### **1.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.**

Puesto que la parada del ciclo celular en G<sub>2</sub>/M es una característica común de los agentes antimitóticos, se llevaron a cabo experimentos destinados al estudio de los ligandos sobre el ciclo celular.

Dichos ensayos se realizaron mediante la técnica de citometría de flujo, determinando el contenido de ADN, en células humanas de carcinoma de ovario A2780 y A2780AD (multirresistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P) y de carcinoma de pulmón A549 en presencia de los compuestos estudiados.

Para ello, se incubaron las células durante 20 horas con las moléculas parentales (**1** y **3**), los análogos y los híbridos de la familia en examen, se analizaron los cambios durante el ciclo celular y se calculó el porcentaje de células en cada fase del ciclo.

En las tres líneas celulares analizadas el ensayo reveló que los compuestos, detuvieron las células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular como indica el elevado número de células con contenido tetraploide de ADN.

En las células A2780 (Figura 25) los compuestos más activos fueron los ligandos **1**, **4**, **6**, **9** y **12**, que exhibieron una actividad muy potente a una concentración más baja (**1**, **4** y **9**) o igual (**6** y **12**) a la del paclitaxel. Los ligandos **3**, **5**, **8** y **10** bloquearon las células en la fase G<sub>2</sub>/M a concentración entre 100 y 400 nM. Los compuestos menos activos fueron los agentes **7**, **11**,

**13, 14, 15 y 16.** Este resultado se correlaciona bien con aquéllos obtenidos en los ensayos anteriores.

A falta de un stock más concentrado no fue posible aumentar la concentración en las condiciones experimentales de los análogos **7 y 16**, cuyas acumulaciones de células en G<sub>2</sub>/M eran menores y se atribuyeron a ello.

Los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular se muestran en la tabla 12.

**Figura 25.** Efecto sobre el ciclo celular en células humanas de carcinoma de ovario A2780, incubadas durante 20 horas en presencia de **1 y 3**, de los derivados **4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11** y los híbridos **12, 13, 14, 15 y 16**. Control: células sin tratar, paclitaxel: control positivo. Se muestra la concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.

Compuesto	% sub G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% S	% G <sub>2</sub> /M
<b>Control</b>	-	64.88	11.08	24.04
<b>Paclitaxel 30 nM</b>	5.08	7.68	9.88	77.36
<b>1 10 nM</b>	15.6	6.82	4.96	72.62
<b>3 100 nM</b>	9.06	16.16	8.9	65.88
<b>4 12.5 nM</b>	10.64	8.12	6.54	74.7
<b>5 150 nM</b>	10.44	12.88	7.9	68.78
<b>6 32 nM</b>	11.04	15.78	6.86	66.32
<b>7 25 µM</b>	12.04	42.26	12.26	33.44
<b>8 200 nM</b>	14.1	18.27	10.26	57.37
<b>9 16 nM</b>	9.22	4.9	5.14	80.74
<b>10 400 nM</b>	11.12	18.8	9.58	60.5
<b>11 900 nM</b>	8.7	13.46	7.9	69.94
<b>12 30 nM</b>	10.04	11.99	7.27	70.7
<b>13 1 µM</b>	5.48	17.32	9.7	67.5
<b>14 5 µM</b>	4.75	4.86	5.95	84.44
<b>15 4 µM</b>	8.24	17.52	8.46	65.78
<b>16 25 µM</b>	11.32	25.68	5.24	57.76

**Tabla 12.** Porcentajes de células A2780 en cada fase del ciclo celular tras la incubación de 20 horas en presencia de la concentración más pequeña de ligandos **1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15** y **16** que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M.

En las células A2780AD (Figura 26) los compuestos seleccionados para el estudio del ciclo celular detuvieron las células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular, a diferencia del paclitaxel que no exhibió ningún efecto en las células ensayadas. Los compuestos más activos fueron los ligandos **1** y **12** que, juntos a los agentes **3, 5** y **6**, bloquearon de forma muy potente las células en G<sub>2</sub>/M. Los menos activos fueron los agentes **14** y **15** (concentraciones de ligandos en el rango µM).

Los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular se muestran en la tabla 13.

**Figura 26.** Efecto sobre el ciclo celular en células humanas multirresistentes de carcinoma de ovario A2780AD, incubadas durante 20 horas en presencia de **1** y **3** y de algunos derivados (**5** y **6**) e híbridos (**12**, **14** y **15**) seleccionados. Control: células sin tratar, paclitaxel: control positivo. Se muestra la concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.

Compuestos		% sub G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% S	% G <sub>2</sub> /M
Control		-	61.92	11.06	27.02
Paclitaxel 2 µM		-	59.38	12.72	27.9
<b>1</b>	<b>30 nM</b>	1.5	4.85	1.87	91.78
<b>3</b>	<b>100 nM</b>	0.08	6.62	4.36	88.94
<b>5</b>	<b>150 nM</b>	2.1	4.88	2.73	90.29
<b>6</b>	<b>60 nM</b>	1.9	35.95	7.13	55.02
<b>12</b>	<b>30 nM</b>	2.22	3.98	1.9	91.9
<b>14</b>	<b>5 µM</b>	0.86	6.18	4.95	88.01
<b>15</b>	<b>4 µM</b>	3.14	29.52	5.32	62.02

**Tabla 13.** Porcentajes de células A2780AD en cada fase del ciclo celular tras la incubación de 20 horas en presencia de la concentración más pequeña de ligandos **1**, **3**, **5**, **6**, **12**, **14**, y **15** que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M.

En las células A549 (Figura 27) los compuestos más activos fueron los ligandos **1**, **4**, **9** y **12**, que exhibieron una actividad muy potente a una concentración más baja (**1**), igual (**9** y **12**) o ligeramente superior (**4**) a la del paclitaxel. Los compuestos **3** y **5** mostraron actividad a una concentración parecida entre sí y algo más baja con respecto a aquéllas observadas en presencia de los ligandos anteriores. Los agentes menos activos fueron las moléculas **11**, **14** y **15**.

Este resultado se correlaciona bien con aquéllos obtenidos en los ensayos anteriores.

En la tabla 14 se muestran los porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular.

**Figura 27.** Efecto sobre el ciclo celular en células humanas de carcinoma de pulmón A549, incubadas durante 20 horas en presencia de **1** y **3** y de algunos derivados (**4**, **5**, **9** y **11**) e híbridos (**12**, **14** y **15**) seleccionados de la familia de dictioestatina y discodermolida. Control: células sin tratar, paclitaxel: control positivo. Se muestra la concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.



Compuesto		% sub G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% S	% G <sub>2</sub> /M
Control		5.59	60.78	10.02	23.61
Paclitaxel	30 nM	10.62	9.06	10.78	69.54
1	10 nM	10.47	17.96	8.69	62.88
3	100 nM	1.74	8.56	6.56	83.14
4	50 nM	8.22	9.6	7.34	74.84
5	150 nM	4.73	7.92	5.89	81.46
9	30 nM	2.68	6.08	4.74	86.5
11	900 nM	0.05	15.72	5.74	78.49
12	30 nM	5.14	18.32	8.76	67.78
14	1 µM	3.36	10.22	4.62	81.8
15	2 µM	1.44	13.6	3.72	81.24

**Tabla 14.** Porcentajes de células A549 en cada fase del ciclo celular tras la incubación de 20 horas en presencia de la concentración más pequeña de ligandos **1, 3, 4, 5, 9, 11, 12, 14, y 15** que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M.

Estos resultados corroboraron la capacidad de los agentes estudiados de afectar al mecanismo de segregación cromosómica y actuar por tanto como agentes antimitóticos.

### 1.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.

#### 1.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.

Dado que la principal característica de los ligandos de la familia de dictiostatina y discodermolida resultó ser su capacidad de estabilizar los microtúbulos, una prueba necesaria de su actividad fue comprobar si inducían el ensamblaje de microtúbulos *in vitro* en un sistema de tubulina GTP pura.

El ensamblaje de tubulina puede considerarse como una polimerización de tubulina por nucleación condensada no covalente caracterizada por un comportamiento cooperativo y por la presencia de una concentración crítica (Cr) por debajo de la cual no se produce formación significativa de los polímeros (Oosawa y Asakura, 1975). Por tanto, la medida de la concentración crítica del ensamblaje de tubulina inducido por un ligando permite determinar el

tipo de efecto modulador de dicho ensamblaje por la serie de compuestos investigada (sean estabilizadores o desestabilizadores), así como cuantificar la potencia de inducción del mismo efecto en las condiciones experimentales empleadas. Disminuciones en el valor de la Cr serán indicativas de agentes estabilizantes de microtúbulos, mientras que aumentos de este valor revelarán la capacidad desestabilizadora de microtúbulos del agente en cuestión (Buey et al., 2005).

Como primer paso comprobamos entonces este tipo de comportamiento de nuestra colección de compuestos, calculando sus correspondientes concentraciones críticas.

Se llevó a cabo la determinación de la Cr de la tubulina en presencia de un 10 % de exceso de concentración de los compuestos estudiados en tampón GAB-1 mM GTP, en el cual la tubulina es capaz de ensamblar, en ausencia de ligando exógeno, con una Cr de 3.3  $\mu\text{M}$  a 37 °C (Buey et al., 2005). Se incubaron las muestras a 37 °C y se centrifugaron tal y como se ha detallado en Materiales y métodos. Posteriormente, se tomaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados. La concentración de proteína en ambas fracciones se determinó empleando la emisión de la fluorescencia intrínseca de la tubulina, convirtiendo dichos valores de fluorescencia en valores de concentración por medio de una curva patrón.

Los valores de Cr obtenidos empleando dicho ensayo se muestran en la tabla 15.

El ligando que indujo el ensamblaje de tubulina de forma más potente fue la dictiostatina (**1**) (Cr 0.4  $\mu\text{M}$ ). Los agentes **3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15** y **16** (Cr 0.6  $\mu\text{M}$ , 1.2  $\mu\text{M}$ , 1.4  $\mu\text{M}$ , 0.5  $\mu\text{M}$ , 1.4  $\mu\text{M}$ , 0.8  $\mu\text{M}$ , 1.1  $\mu\text{M}$ , 1.2  $\mu\text{M}$ , 1.5  $\mu\text{M}$ , 0.9  $\mu\text{M}$ , 1.8  $\mu\text{M}$ , respectivamente) indujeron dicho ensamblaje, aunque de forma más débil que la dictiostatina. Los compuestos menos activos fueron los análogos **2** y **17**, con una Cr de 3.3  $\mu\text{M}$  y 3.2  $\mu\text{M}$  respectivamente (prácticamente idénticas a aquella obtenida en ausencia de ligando).

Todos los resultados obtenidos hasta ahora confirmaron la capacidad estabilizadora de los compuestos estudiados *in vitro* y en las condiciones experimentales empleadas.

Compuesto	Cr ( $\mu\text{M}$ )
1	$0.4 \pm 0.07$
2	$3.3 \pm 0.06$
3	$0.6 \pm 0.09$
4	$1.2 \pm 0.001$
5	$1.4 \pm 0.004$
6	$2.2 \pm 0.01$
7	$2.5 \pm 0.05$
8	$2.5 \pm 0.04$
9	$0.5 \pm 0.01$
10	$1.4 \pm 0.01$
11	$0.8 \pm 0.002$
12	$1.1 \pm 0.02$
13	$1.2 \pm 0.01$
14	$1.5 \pm 0.01$
15	$0.9 \pm 0.01$
16	$1.8 \pm 0.005$
17	$3.2 \pm 0.04$

**Tabla 15.** Modulación del ensamblaje de tubulina en presencia de los compuestos investigados en GAB-1 mM GTP. Se indican las concentraciones críticas (valor promedio y error estándar de mínimo tres experimentos independientes) del ensamblaje de tubulina en presencia de un 10 % de exceso de ligando con respecto a la concentración de proteína.

#### **1.4. Determinación de la unión de los agentes estabilizantes de microtúbulos a tubulina no polimerizada.**

##### **1.4.1. Unión de discodermolida al heterodímero de $\alpha,\beta$ tubulina.**

Otra característica de los agentes estabilizantes de microtúbulos es su capacidad de inducir el ensamblaje de microtúbulos en condiciones en que la tubulina misma es incapaz de ensamblar (unión de GDP y ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ ). Por tanto, se consideraba posible la unión de dichos agentes al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina no ensamblada.

Hace unos años se estudió la unión del paclitaxel y de su análogo docetaxel a la tubulina en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (Díaz et al., 1993), utilizando

concentraciones de hasta 10  $\mu\text{M}$  de paclitaxel y 50  $\mu\text{M}$  de docetaxel. En estas condiciones experimentales, la baja afinidad de los ligandos impidió la detección de su unión al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina no polimerizada (Díaz et al., 1993).

El descubrimiento de nuevos agentes con una mejor solubilidad y una mayor afinidad por los microtúbulos, como la discodermolida, permitió utilizar una concentración más alta de ligando libre y así poder evaluar su unión al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina.

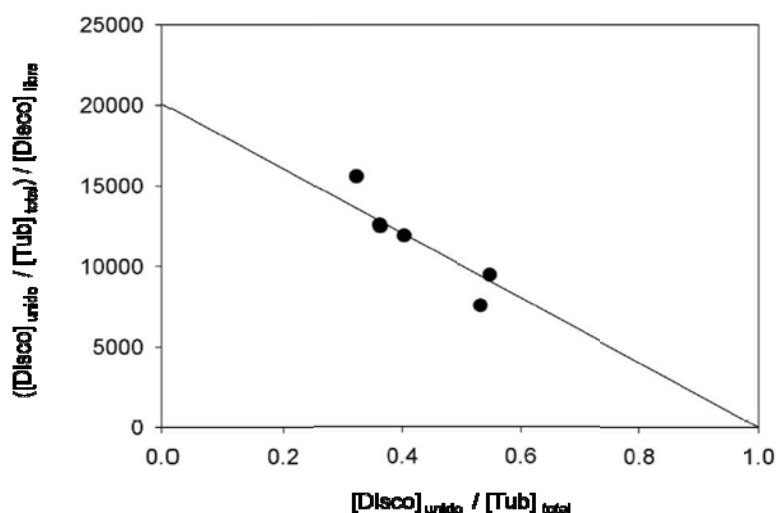
Para ello, se realizó un ensayo de centrifugación, tal y como se ha detallado en el apartado correspondiente de Materiales y métodos, y así comprobar la existencia de unión en tubulina dimérica.

El resultado del ensayo empleado (Figura 28) indicó que la discodermolida cosedimentó con el heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina no polimerizada en ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (condición en la que la tubulina no se encuentra polimerizada) (Andreu et al., 1989). Sin embargo, dada la baja afinidad de unión observada (en el rango de  $10^4 \text{M}^{-1}$ ) no fue posible alcanzar la saturación a la concentración máxima posible de ligando y de este modo no pudo ser determinada la estequiometría de la interacción. Sin embargo, puesto que el análisis de Scatchard indicó  $0.85 \pm 0.22$  de sitios, se asumió una estequiometría de la interacción de 1:1, que resultó en una constante de unión de  $2.0 \pm 0.7 \times 10^4 \text{M}^{-1}$ .

Con el fin de comprobar la especificidad del proceso, se realizaron experimentos de competición. Se incubaron la discodermolida y la epotilona B (otro agente estabilizante de microtúbulos) a una concentración de 55  $\mu\text{M}$ , por separado y conjuntamente, en  $\text{D}_2\text{O}$  (para estabilizar la proteína) en presencia de tubulina (45  $\mu\text{M}$ ) en 10 mM fosfato sódico, 0.1 mM GTP,  $\text{pH}^* 7.0$ . Cuando los dos ligandos fueron incubados separadamente se encontraron 0.35 moles de epotilona B y 0.17 moles de discodermolida por moles de tubulina unidas a la proteína; por lo contrario, cuando fueron incubados conjuntamente, las estequiometrías se redujeron a 0.21 y 0.09, respectivamente.

Este resultado indicó que los dos compuestos ensayados competían (al menos parcialmente) por el mismo sitio.

Repeticiones control en H<sub>2</sub>O de los correspondientes experimentos dieron los mismos resultados.



**Figura 28.** Análisis de Scatchard de la unión de discodermolida al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina no polimerizada en presencia de 10 mM fosfato sódico, 0.1 mM GTP, pH 7.0, 25 °C.

La tubulina purificada es una proteína inestable que se desnaturaliza rápidamente en solución acuosa. Se describió que el D<sub>2</sub>O es capaz de estabilizar esta proteína (Chakrabarti et al., 1999) y de la misma forma conjuntos de proteínas, incluyendo a los microtúbulos (Schuck, 2000), evitando su desactivación y agregación.

Con el fin de determinar el estado de oligomerización de la tubulina en nuestros experimentos y descartar posibles cambios debidos a la presencia de D<sub>2</sub>O o a la unión del ligando, se analizaron mediante velocidad de sedimentación en una ultracentrífuga analítica muestras que contenían 13 y 45  $\mu$ M de tubulina en 10 mM fosfato sódico, 0.1 mM de GTP en D<sub>2</sub>O, pH 7.0, a 25 °C. Dos horas después del equilibrado en el tampón, las muestras mostraron más del 90 % de 5.8 S heterodímeros de  $\alpha,\beta$  tubulina. Bajo estas condiciones experimentales, la incubación en presencia de docetaxel o de discodermolida a

una concentración de 55  $\mu\text{M}$  no indujo agregación del heterodímero. Como consecuencia, se confirmó el estado no polimerizado de la tubulina.

## **1.5. Determinación del sitio de unión de los ligandos en microtúbulos.**

### **1.5.1. Medida de las constantes de unión de los ligandos a microtúbulos estabilizados: desplazamiento de flutax-2 y epotilona B.**

Una vez confirmada la naturaleza de los compuestos estudiados como agentes que se unen a los microtúbulos y estabilizan dichos polímeros *in vitro* y en células, se analizó su sitio de unión midiendo sus constantes de unión a microtúbulos estabilizados.

Para ello, se realizaron estudios de desplazamiento de un derivado fluorescente de paclitaxel, flutax-2, (Andreu and Barasoain, 2001) a distintas temperaturas: 26, 27, 30, 32, 35, 37, 40 y 42 °C.

El desplazamiento de flutax-2 puede medirse fácilmente por los cambios en los valores de anisotropía de fluorescencia de este mismo ligando. La sonda unida a su diana posee un valor de anisotropía de fluorescencia mucho mayor que el de la sonda libre de modo que el desplazamiento, por cualquier ligando competidor de la interacción de flutax-2 con la diana, se detecta midiendo el descenso del valor de anisotropía de la fluorescencia de la sonda.

Las medidas se tomaron al menos tres veces de manera independiente y sus medias y desviaciones estándar están recogidas en la tabla 16.

Tal y como se puede observar, el ligando con mayor afinidad resultó ser la discodermolida (**3**) ( $k_b 555 \pm 111 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), que es casi 500 veces más afín que el paclitaxel ( $k_b 1.4 \pm 0.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C) y unas 150 veces más afín que el docetaxel ( $k_b 4 \pm 0.3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C). La discodermolida tiene 30 veces más afinidad por el sitio que la dictiostatina (**1**) ( $k_b 19.2 \pm 2.5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C). Los ligandos más débiles fueron los compuestos **2** ( $k_b 0.0041 \pm 0.0026 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **7** ( $k_b 0.06 \pm 0.01 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **10** ( $k_b 0.54 \pm 0.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **11** ( $k_b 0.28 \pm 0.05 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **13** ( $k_b 0.73 \pm 0.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **14** ( $k_b 0.033 \pm 0.005 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **15** ( $k_b 0.32 \pm 0.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **16** ( $k_b 0.35 \pm 0.08 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C) y **17** ( $k_b 0.0145 \pm 0.002 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C). La

afinidad de unión de los ligandos **5** ( $k_b$   $2.2 \pm 0.4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C) y **8** ( $k_b$   $1.6 \pm 0.2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C) se situaron entre aquellas del paclitaxel y docetaxel.

En estos ensayos destacaron los compuestos **4**, **6**, **9** y **12**, cuya afinidad se manifestó muy alta y la medida de su constante de unión poco precisa, encontrándose desviaciones muy grandes respecto a las medias (Tabla 17). Estas constantes fueron varios órdenes de magnitud por encima de la del flutax-2 y lo desplazaron completamente a concentraciones equimolares, impidiendo la determinación correcta de las constantes de afinidad. Como consecuencia, se repitió la determinación de estos valores utilizando otro método más apropiado para este caso.

En este sentido, diseñamos una prueba de desplazamiento de epotilona B, compuesto que se une a los microtúbulos en el sitio de paclitaxel con una afinidad mayor que la del flutax-2 (Buey et al., 2004). En este ensayo, los microtúbulos estabilizados se incubaron en presencia de epotilona B y del compuesto del que debíamos medir su afinidad. Posteriormente, la mezcla se centrifugó para sedimentar los microtúbulos. Al separar sobrenadante y pellet separamos también ligandos unidos a su sitio y ligandos libres. Tras extraer los compuestos de la mezcla con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y añadir docetaxel como estándar interno, los ligandos se separaron mediante HPLC y fueron cuantificados midiendo las áreas bajo sus picos en los cromatogramas (Tabla 17).

# A

Compuesto	26 °C	27 °C	30 °C	32 °C
<b>Paclitaxel<sup>a</sup></b>	2.64 ± 0.2	2.2 ± 0.05	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.2
<b>Docetaxel<sup>a</sup></b>	7 ± 0.4	6.6 ± 0.5	5.4 ± 0.4	4.9 ± 0.4
<b>1<sup>a</sup></b>	35.5 ± 7.4	32 ± 5.5	24.8 ± 2.9	23.1 ± 2.8
<b>2</b>	0.0051 ± 0.003	0.005 ± 0.003	0.0047 ± 0.003	0.0048 ± 0.0035
<b>3<sup>a</sup></b>	872 ± 82	837 ± 77	958 ± 134	704 ± 95
<b>5</b>	2.4 ± 1.2	2.5 ± 1.1	2.6 ± 1.2	2.4 ± 1.2
<b>7</b>	0.06 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01
<b>8</b>	2.1 ± 0.4	1.9 ± 0.5	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.4
<b>10</b>	0.62 ± 0.3	0.66 ± 0.3	0.57 ± 0.2	0.62 ± 0.25
<b>11</b>	0.33 ± 0.05	0.36 ± 0.1	0.29 ± 0.1	0.27 ± 0.1
<b>13</b>	1.13 ± 0.3	1.12 ± 0.3	0.98 ± 0.2	0.95 ± 0.15
<b>14</b>	0.07 ± 0.03	0.055 ± 0.02	0.043 ± 0.01	0.04 ± 0.01
<b>15</b>	0.29 ± 0.1	0.29 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.33 ± 0.07
<b>16</b>	0.32 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
<b>17</b>	0.0175 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.0165 ± 0.005	0.018 ± 0.005

# B

Compuesto	35 °C	37 °C	40 °C	42 °C
<b>Paclitaxel<sup>a</sup></b>	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1 ± 0.1	0.9 ± 0.2
<b>Docetaxel<sup>a</sup></b>	4 ± 0.3	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.2	2.4 ± 0.1
<b>1<sup>a</sup></b>	19.2 ± 2.5	16.8 ± 2	14.1 ± 1.8	14.2 ± 1.7
<b>2</b>	0.0041 ± 0.0026	0.0035 ± 0.002	0.0037 ± 0.001	0.0035 ± 0.002
<b>3<sup>a</sup></b>	555 ± 111	526 ± 72	547 ± 60	321 ± 73
<b>5</b>	2.2 ± 0.4	2.2 ± 0.45	1.9 ± 0.25	1.87 ± 0.4
<b>7</b>	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.2
<b>8</b>	1.6 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	1.2 ± 0.3
<b>10</b>	0.54 ± 0.2	0.51 ± 0.2	0.49 ± 0.2	0.45 ± 0.2
<b>11</b>	0.28 ± 0.05	0.25 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.23 ± 0.02
<b>13</b>	0.73 ± 0.1	0.71 ± 0.1	0.56 ± 0.1	0.58 ± 0.08
<b>14</b>	0.033 ± 0.005	0.025 ± 0.004	0.029 ± 0.004	0.028 ± 0.01
<b>15</b>	0.32 ± 0.1	0.33 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.28 ± 0.05
<b>16</b>	0.35 ± 0.08	0.35 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.25 ± 0.07
<b>17</b>	0.0145 ± 0.002	0.0145 ± 0.001	0.0175 ± 0.003	0.0185 ± 0.002



**Tabla 16.** Constantes de unión a microtúbulos estabilizados ( $10^7 \text{ M}^{-1}$ ) medidas por desplazamiento de flutax-2 a diferentes temperaturas. **A:** Valores de las constantes de unión medidas a: 26, 27, 30 y 32 °C. **B:** Valores de las constantes de unión medidas a: 35, 37, 40 y 42 °C. Se muestra el valor medio y la desviación estándar de un total de tres experimentos independientes. <sup>a</sup> Buey et al., 2005.

Gracias a este ensayo pudimos determinar las constantes de los compuestos **4**, **6**, **9** y **12** a 25, 30, 35 y 40 °C.

Los resultados del ensayo de desplazamiento de epotilona B se muestran en la tabla 17; también se muestra la comparación de los valores de constante de afinidad obtenidos empleando ambos métodos.

En las condiciones experimentales ensayadas, el ligando más afín resultó ser el compuesto **9** ( $k_b 113.8 \pm 3.25 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), seguido por el compuesto **12** ( $k_b 65.2 \pm 2.6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C), **4** ( $k_b 53.8 \pm 4.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C) y **6** ( $k_b 32.6 \pm 3.4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  a 35 °C).

Compuesto	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	35 °C Flutax-2
<b>4</b>	119.3 ± 3	68.5 ± 8	53.8 ± 4.8	34 ± 1.3	77 ± 46
<b>6</b>	88.1 ± 14	55 ± 3	32.6 ± 3.4	26.4 ± 2.5	35.7 ± 11.6
<b>9</b>	229.7 ± 22	175 ± 16.5	113.8 ± 3.25	63.4 ± 2	146.7 ± 68
<b>12</b>	106.4 ± 32	75.1 ± 4	65.2 ± 2.6	32.2 ± 1.5	72.2 ± 23

**Tabla 17.** Constantes de unión a microtúbulos estabilizados ( $10^7 \text{ M}^{-1}$ ) medidas por desplazamiento de epotilona B. Se indica el valor medio y la desviación estándar de un total de tres experimentos independientes. Se muestra la comparación de las medidas obtenidas con los dos métodos (desplazamiento de flutax-2 y epotilona B) a 35 °C.

Los resultados obtenidos confirmaron la unión de todos los ligandos estudiados al sitio del paclitaxel en los microtúbulos.

#### **1.5.1.1. Energía libre de Gibbs.**

Una vez conocidas las constantes de unión de los compuestos a su sitio, fue posible calcular el cambio de energía libre ( $\Delta G$ ) del proceso de unión a una determinada temperatura aplicando la siguiente fórmula:

$$\Delta G = -R T \ln K_{(l)}$$

Siendo R la constante de los gases, T la temperatura y  $K_{(l)}$  la constante de unión del ligando medida a la temperatura T. En la tabla 18 se muestran las energías a 35 °C calculadas para cada uno de los compuestos.

#### **1.5.1.2. Entalpía y entropía.**

Obtenidas dichas constantes a distintas temperaturas, se obtuvo el cambio de entalpía del proceso de unión ( $\Delta H$ ) siendo:

$$\Delta H = -m R$$

Donde m es la pendiente calculada de la representación del inverso de la temperatura frente al logaritmo neperiano de la constante de afinidad (representación de Van't Hoff).

Las figuras 29 y 30 muestran estas representaciones para unos compuestos seleccionados (ejemplos representativos) y el ajuste de cada una de las rectas.

**Figura 29.** Representación de Van't Hoff del proceso de unión de unos ligandos seleccionados de la familia de dictiostatina y discodermolida a microtúbulos estabilizados, medidos por desplazamiento de flutax-2. Se muestra el valor medio y el error estándar de un total de al menos tres experimentos independientes.

**Figura 30.** Representación de Van't Hoff del proceso de unión de los ligandos a microtúbulos estabilizados, medidos por desplazamiento de epotilona B. Se muestra el valor medio y el error estándar de un total de al menos tres experimentos independientes.

La entropía (S) será el opuesto de la pendiente de la recta obtenida como consecuencia de representar la temperatura frente a la energía libre de Gibbs:

Los parámetros de la unión de los compuestos de la familia dictiostatina y discodermolida a su sitio se recogen en la tabla 18.

Compuesto	$\Delta G$ 35 °C (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )
<b>Paclitaxel</b>	-42.1 ± 0.4	-51.1 ± 3.2	-29.4 ± 10.5
<b>Docetaxel</b>	-44.8 ± 0.2	-52.3 ± 2.3	-25.0 ± 8
<b>1</b>	-48.8 ± 0.3	-45.9 ± 2.6	9.5 ± 8.5
<b>2</b>	-27.2 ± 2.6	-20.2 ± 2.8	22.7 ± 9.3
<b>3</b>	-57.7 ± 0.3	-33.2 ± 7.6	79.5 ± 2.5
<b>4<sup>a</sup></b>	-51.5 ± 0.2	-62.2 ± 6.0	-35.1 ± 19.7
<b>5</b>	-43.3 ± 0.5	-14.6 ± 2.8	92.4 ± 9.2
<b>6<sup>a</sup></b>	-50.2 ± 0.3	-64.3 ± 7.0	-44.1 ± 23.1
<b>7</b>	-34.1 ± 0.5	-16.0 ± 9.0	55.9 ± 30
<b>8</b>	-42.5 ± 0.3	-23.4 ± 2.3	61.5 ± 7.5
<b>9<sup>a</sup></b>	-53.4 ± 0.1	-66.4 ± 8.4	-44.1 ± 27.4
<b>10</b>	-39.7 ± 1.2	-16.6 ± 2.4	74.7 ± 7.7
<b>11</b>	-38 ± 0.5	-14.8 ± 5	75.5 ± 16.2
<b>12<sup>a</sup></b>	-52 ± 0.1	-57.6 ± 12.6	-21.3 ± 4.2
<b>13</b>	-40.5 ± 0.4	-36.8 ± 2.9	12.3 ± 9.2
<b>14</b>	-32.5 ± 0.4	-44 ± 7.3	-35.2 ± 23.8
<b>15</b>	-38.3 ± 0.9	-6.5 ± 5.6	145.2 ± 18.7
<b>16</b>	-38.6 ± 0.9	-15 ± 6.7	74.8 ± 21.6
<b>17</b>	-30.4 ± 0.4	-3.8 ± 0.6	88.5 ± 19.5

**Tabla 18.** Parámetros termodinámicos del proceso de unión de los compuestos de la familia dictiostatina y discodermolida a su sitio. Se muestra el valor medio y el error estándar de al menos un número total de tres experimentos independientes. <sup>a</sup> Compuestos cuyas constantes de unión fueron medidas por desplazamiento de epotilona B.

## 1.6. Estructura de microtúbulos inducidos por ligandos.

### 1.6.1. Determinación del diámetro de los microtúbulos (SAXS: *small angle X-ray scattering*).

El número de protofilamentos que componen los microtúbulos cuando éstos se ensamblan *in vitro* oscila dependiendo de las condiciones experimentales (*in vivo* generalmente son trece). Se descubrió que la presencia de taxanos puede modificar el número de protofilamentos y por tanto su diámetro (Andreu et al., 1994). Al ensamblar microtúbulos en presencia de una de dichas drogas no se

obtiene una población homogénea, y el número de protofilamentos que se calcula representa un promedio. Así, la unión del paclitaxel a los microtúbulos resultó en un descenso medio del número de protofilamentos que forman el microtúbulo de 0.9 (Andreu et al., 1992), mientras que la unión del docetaxel apenas altera la estructura de los microtúbulos (Andreu et al., 1994).

Con el fin de profundizar en el estudio del ensamblaje de microtúbulos en presencia de los compuestos objeto de estudio y determinar el radio medio y el número de protofilamentos que componen los microtúbulos inducidos por dichos ligandos, se realizaron estudios de difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS), gracias a la ayuda de la Dr. Aurora Nogales, del Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR, CSIC) de Madrid.

Dado que se necesitan cantidades relativamente grandes de ligando para poder emplear dicha técnica, solo se pudieron estudiar los microtúbulos inducidos por unos compuestos seleccionados de la familia en examen (**1**, **3**, **5**, **6**, **11**, **12**, **14** y **15**).

Se midieron los perfiles de dispersión de muestras de microtúbulos ensamblados en presencia de los agentes seleccionados, y dichos perfiles se compararon con aquéllos obtenidos a partir de muestras de microtúbulos ensamblados en ausencia de compuesto.

Los patrones de dispersión de rayos X que se obtuvieron para las distintas muestras se diferenciaron principalmente en el desplazamiento del máximo de la función de Bessel ( $J_0$ ), lo cual es indicativo de perturbaciones en el diámetro de los polímeros formados y por tanto en el número de protofilamentos (Abramowitz and Stegun, 1965).

Los datos obtenidos indicaron diferentes resultados, dependiendo del compuesto empleado. En el caso de los compuestos **15**, **3<sup>c</sup>** y **3<sup>d</sup>** se observó una disminución de 0.7, un ascenso de 0.8 y de 1.1 en el número de los protofilamentos, respectivamente. En el caso de los otros ligandos, al igual que con el docetaxel, no se produjo una alteración muy evidente en el diámetro de los polímeros, manteniéndose por tanto constante el número medio de protofilamentos observados en ausencia de droga (DMSO) (Tabla 19).

Compuesto	$J_{01} \text{ (nm}^{-1}\text{)}$	$J_{02} \text{ (nm}^{-1}\text{)}$	Media del radio (nm)	n° de protofilamentos
DMSO	0.049	0.091	12.53	13.6
Paclitaxel <sup>a</sup>	0.052	0.099	11.51	12.7
Docetaxel <sup>b</sup>	0.049	0.090	12.45	13.7
1	0.0464	0.0515	12.47	13.7
3 <sup>a</sup>	0.0478	0.0456	13.07	14.4
3 <sup>b</sup>	0.0438	0.0479	13.33	14.7
5	0.0477	0.0509	12.39	13.65
6	0.0506	0.0491	12.24	13.5
11	0.0514	0.0502	12.01	13.2
12	0.0511	0.0500	12.07	13.3
14	0.0495	0.0518	12.04	13.3
15	0.0516	0.0526	11.7	12.9

**Tabla 19.** Posiciones de los máximos de la función de dispersión de rayos X en disolución de los microtúbulos inducidos en ausencia o presencia de paclitaxel, docetaxel y ligandos de la familia de dictiostatina y discodermolida. Los radios helicoidales de los microtúbulos (expresados en nm) y el número de protofilamentos se calcularon por interpolación, usando los resultados previamente descritos (Andreu et al., 1992; Andreu et al., 1994; Díaz et al., 1994). Debido a las limitaciones de ligando disponible, no se pudo medir el resto de compuestos. Las desviaciones de la posición de los máximos de  $J_0$  son típicamente de  $0.001 \text{ nm}^{-1}$ . <sup>a</sup> (Andreu et al., 1992). <sup>b</sup> (Andreu et al., 1994). <sup>c</sup> Ensayo realizado en presencia de 5 mM de  $\text{Mg}_2\text{Cl}$  en el tampón. <sup>d</sup> Ensayo realizado en presencia de 7 mM  $\text{Mg}_2\text{Cl}$  en el tampón.

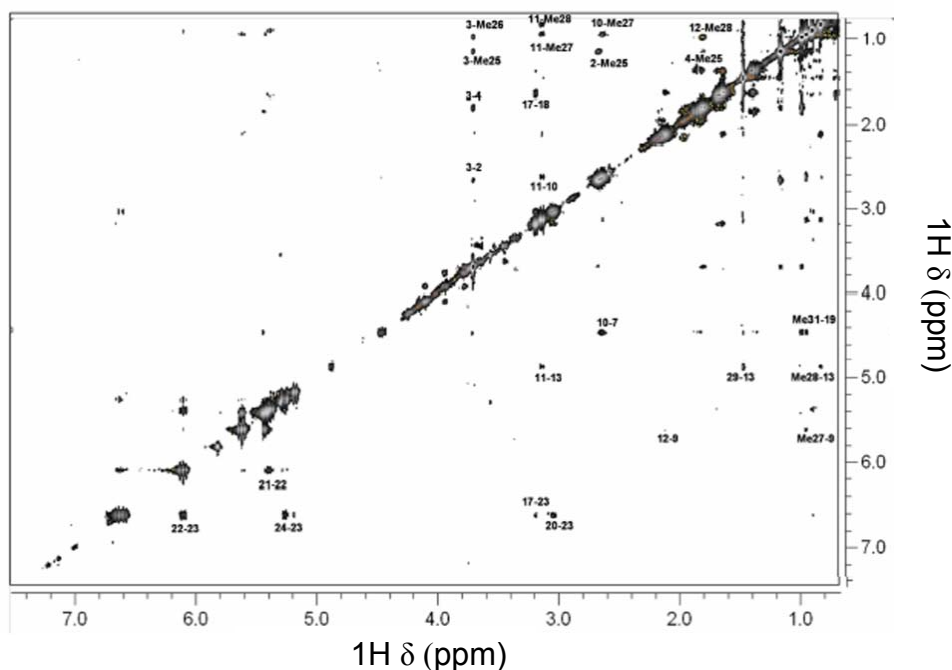
## 1.7. Estudio de la conformación de los compuestos unidos al heterodímero de $\alpha,\beta$ tubulina y microtúbulos.

### 1.7.1. Resonancia magnética nuclear (RMN) y modelado molecular.

Con el fin de comprender a nivel atómico los mecanismos empleados por los agentes estabilizantes de microtúbulos estudiados en la inducción del ensamblaje de dichos polímeros se llevaron a cabo experimentos de RMN, por la Dra. Angeles Canales, y Don Javier Rodriguez en nuestro laboratorio, en el marco de la colaboración que mantenemos con el Profesor Jiménez-Barbero del Centro de Investigaciones Biológicas de Madrid. Anteriormente, la

conformación enlazada de la discodermolida (**3**) a los microtúbulos se determinó por el mismo grupo (Canales et al., 2008).

En el presente trabajo de investigación, se realizaron experimentos TR-NOESY (efecto nuclear transferido Overhauser) para evaluar la conformación enlazada del ligando **3** al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina (Figura 31).

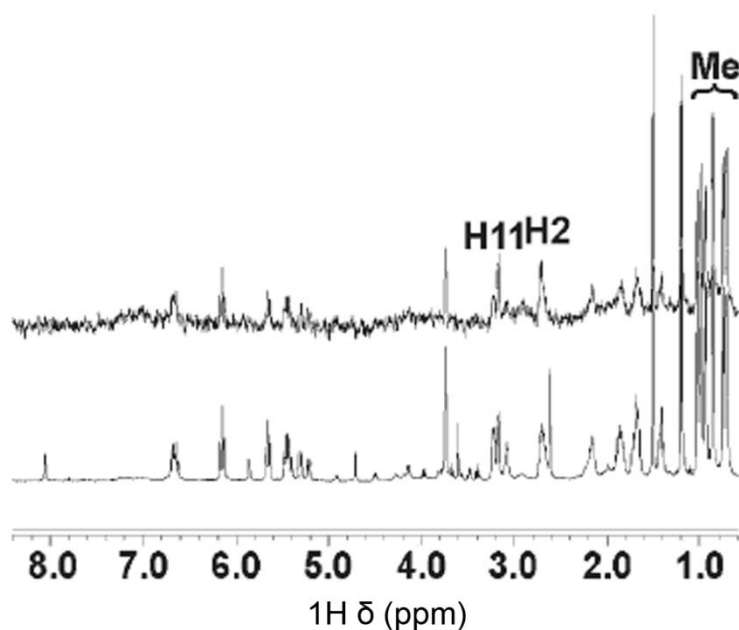


**Figura 31.** Espectro TR-NOESY del ligando **3** en presencia del heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina ( $D_2O$ , 298 K).

Asimismo, se evaluó la interacción de este compuesto con los diversos estados de agregación de la tubulina (heterodímero  $\alpha,\beta$  y microtúbulos) mediante experimentos de STD (diferencia de transferencia de saturación).

Con estos experimentos se detectó la unión del compuesto **3** al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina. Los espectros se adquirieron en  $D_2O$ , 10 mM fosfato sodico, 0,1 mM GTP, pH 7.0 (Figura 32).

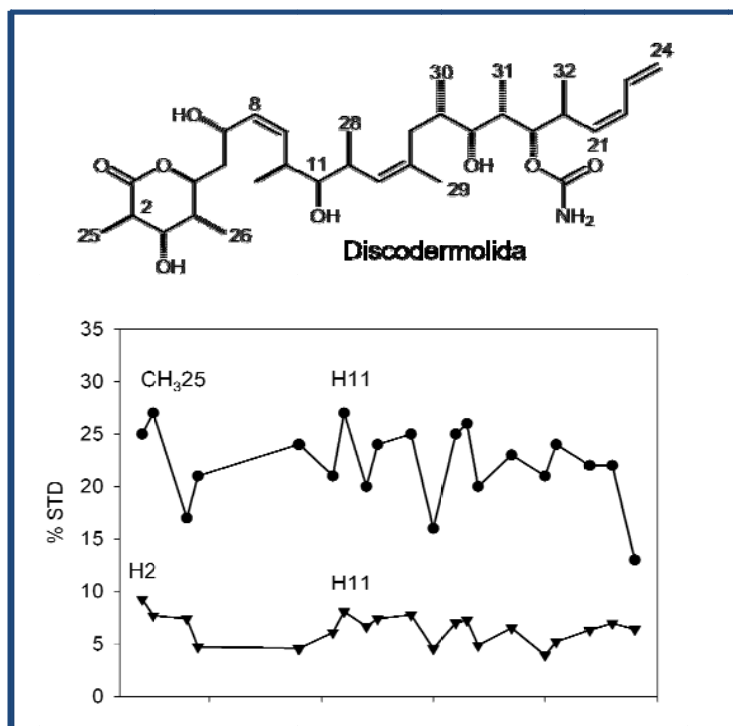




**Figura 32.** Experimento de “Off-resonance” de RMN (500 MHz, experimento de referencia) (línea inferior) y espectro STD (línea superior) del compuesto **3** unido al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina. Se marcan los protones con mayor STD.

La comparación de los perfiles de STD del compuesto **3** unido a la tubulina no polimerizada y a los microtúbulos permitió identificar los protones que estuvieran más cerca a la proteína en cada estado de agregación del sistema.

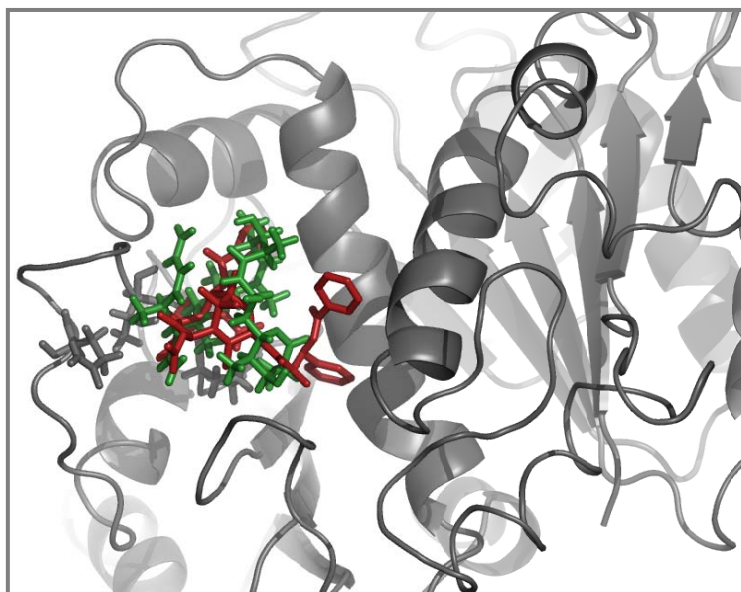
Los perfiles resultaron ser similares, aunque no idénticos. Los valores absolutos del efecto STD detectado en los protones del ligando estudiado fueron bastante uniformes dentro de la molécula, tanto para los microtúbulos como para el heterodímero  $\alpha,\beta$  de tubulina. En presencia de los microtúbulos los protones con mayor efecto STD fueron H11 y 25-CH<sub>3</sub>, mientras que en el caso de los heterodímeros de  $\alpha,\beta$  tubulina fueron H2 y H11 (Figura 33).



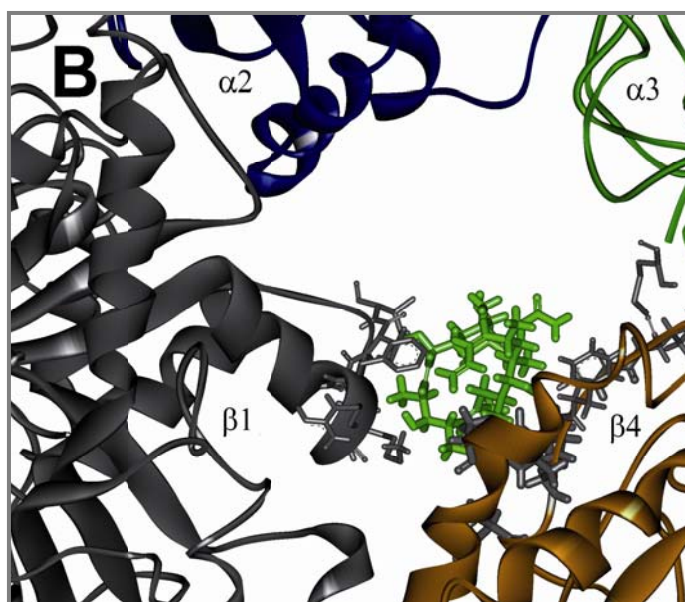
**Figura 33.** Comparación entre los perfiles STD del ligando **3** unido a los microtúbulos (línea azul) y al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina (línea verde).

Basándonos en estas informaciones y usando un método de *docking* dirigido por RMN, se propuso un modelo tridimensional para el complejo de la discodermolida unida al poro externo (poro tipo I) de los microtúbulos. Empleando la misma metodología, en trabajos anteriores, se obtuvo el modelo de dicho ligando unido al sitio luminal (Canales et al., 2008), con respecto al paclitaxel (Figura 34).

La conformación unida de la discodermolida a los heterodímeros de  $\alpha,\beta$  tubulina y a los microtúbulos fueron esencialmente idénticas. En el caso de los microtúbulos la molécula ocupó la parte más baja del poro (Figura 35), cerca de las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 4$  (Canales et al., 2011).



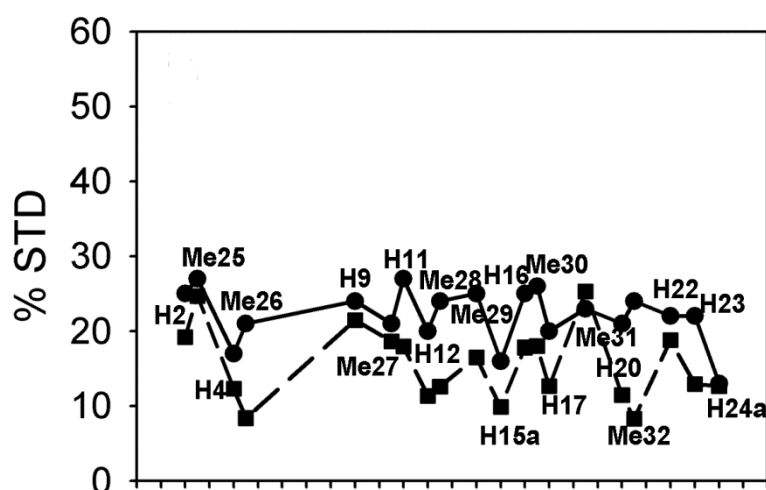
**Figura 34.** *Docking* de discodermolida (**3**) en el sitio luminal de los microtúbulos. El ligando **3** está marcado en verde claro; el paclitaxel en rojo y la  $\beta$  tubulina en gris. El sitio de unión del ligando objeto de estudio se correlaciona perfectamente con el sitio del paclitaxel.



**Figura 35.** *Docking* de discodermolida (**3**) en los microtúbulos en el poro tipo I. Se evidencian los cuatro heterodímeros de tubulina que forman el poro: 1 (gris), 2 (azul), 3 (verde) y 4 (naranja). El ligando **3** está marcado en verde claro.

Los perfiles teóricos de STD de los modelos de *docking* descritos anteriormente se calcularon utilizando el programa CORCEMA-ST y se compararon con los datos experimentales obtenidos. En el caso del ligando unido a los microtúbulos, el mejor ajuste entre los datos de RMN experimentales y las soluciones de *docking* (Figura 36, NRMSD = 22,4 %) se encontró para el sitio del poro tipo I. El hidroxilo en posición C11 se unió a través de dos puentes de hidrógeno con los residuos Lys218 y Phe214 en  $\beta$ 1, mientras que el hidroxilo C7 formó un puente de hidrógeno con el residuo Thr220 siempre en  $\beta$ 1. Asimismo, se estableció un enlace de hidrógeno adicional entre el carbonilo del residuo Val93 en  $\beta$ 4 y el grupo hidroxilo en posición 17. Me30 se encontró cerca de Phe92 en  $\beta$ 4, mientras que el resto del carbamato del ligando formó un puente de hidrógeno con el grupo carbonilo de Phe94 en  $\beta$ 4. Las soluciones de *docking* situadas en el sitio interno proporcionaron un ajuste mucho más pobre con los datos experimentales de STD (NRMSD = 61,6 %).

Como consecuencia, la combinación de los experimentos de RMN/*docking* empleados fue de gran utilidad para confirmar como sitio de unión de la discodermolida a los microtúbulos aquél presente en el poro tipo I.

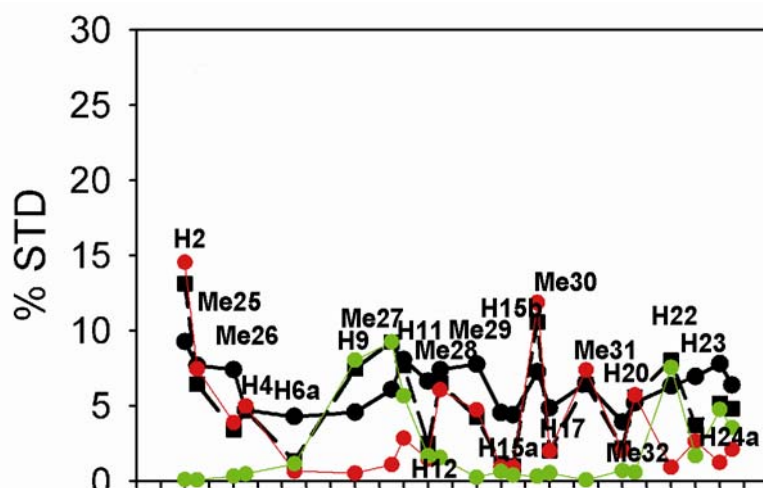


**Figura 36.** Comparación entre datos experimentales y teóricos de STD (CORCEMA-ST) de la discodermolida en presencia de los microtúbulos. Se muestran los efectos experimentales del STD (línea continua y círculos) en comparación con los valores calculados (línea discontinua y

cuadrados). Los parámetros empleados en los cálculos CORCEMA fueron los siguientes: tiempo de correlación de unión, 100 ns;  $k_{\text{off}}$ , 100 s<sup>-1</sup>; y  $k_{\text{on}}$ , 10<sup>8</sup> s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup>, por la unión controlada por difusión.

En la unión de la discodermolida al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina en la tubulina sin ensamblar no fue posible ajustar los valores experimentales de STD con un solo modelo, debido a la falta de las interacciones del compuesto con el sitio del poro completo. De hecho, la cavidad completa sólo está presente en los microtúbulos ya formados. Por tanto, al fin de obtener una visión estructural de la interacción de los compuestos miméticos de paclitaxel con un modelo del poro parcialmente formado, se evaluaron modelos de *docking* adicionales. El primer modelo empleado sólo contenía la subunidad  $\beta 1$  (la región que proporcionó el mejor ajuste entre RMN experimental y las predicciones CORCEMA-ST para los microtúbulos). Un segundo modelo se calculó considerando sólo la subunidad  $\beta 4$ . También se evaluaron modelos adicionales del ligando unido al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina en el sitio de unión luminal. El ajuste entre los datos experimentales y los cálculos CORCEMA-ST se llevó a cabo mediante la evaluación de los tres supuestos sitios de unión: el sitio interno, el semisitio externo en  $\beta 1$  y el semisitio externo en  $\beta 4$ .

En presencia de la discodermolida, ni el modelo de *docking* descrito en el sitio luminal, NRMSD = 27,6 % (línea roja sutil, figura 36) (Canales et al., 2008), ni las estructuras parcialmente formadas del poro, NRMSD = 55,5% (línea verde sutil, figura 37), proporcionaron un buen ajuste entre los valores calculados y experimentales de STD. Una combinación lineal de los perfiles calculados de STD de ambas posibles conformaciones de unión resultó ser el mejor ajuste (NRMSD = 19,5 %).



**Figura 37.** Comparación entre datos experimentales y teóricos de STD (CORCEMA-ST) de la discodermolida en presencia de los heterodímeros de  $\alpha,\beta$  tubulina. Se muestran los efectos experimentales de STD (línea continua y círculos) obtenidos cuando el ligando se une a los dímeros de tubulina, comparados con los valores calculados cuando dicho ligando está acoplado en el semisito en  $\beta 4$  (círculos verdes y línea sutil) y con los valores estimados cuando se une al sitio luminal (círculos rojos y la línea sutil). La mejor aproximación se encontró para la combinación de estas dos conformaciones (línea discontinua gruesa y cuadrados negros).

### 1.8. Cristalografía de discodermolida a su sitio de unión en la tubulina.

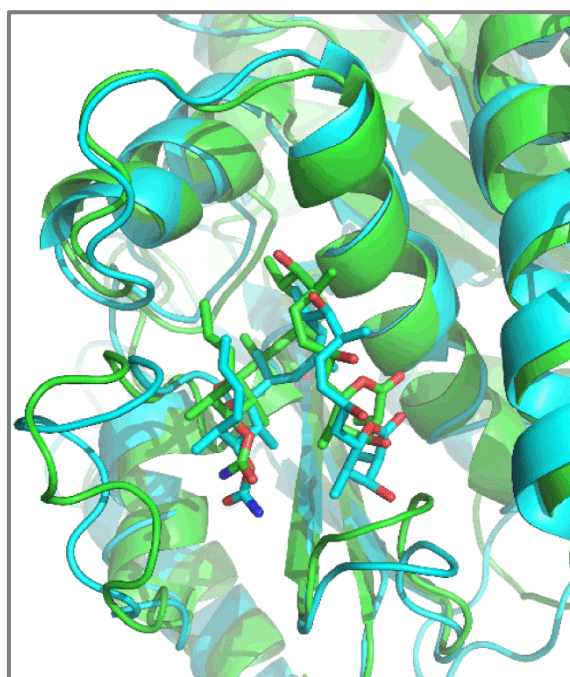
Con el fin de corroborar el modo de unión del compuesto parental **3** a los microtúbulos obtenida mediante experimentos de RMN, se llevaron a cabo experimentos de cristalografía, por el grupo del Dr. Steinmetz, en el *Paul Scherrer Institut*, Villigen PSI (Suiza).

Para ello, se cristalizó el complejo entre  $\alpha,\beta$  tubulina y discodermolida, determinando su estructura mediante cristalografía de rayos-X. El ligando estudiado resultó profundamente enterrado en el bolsillo de la subunidad  $\beta$  de la tubulina, comúnmente conocido como sitio de unión de los taxanos a los microtúbulos.

Dicho resultado confirmó aquello previamente obtenido por resonancia magnética nuclear (Figura 38).

La estructura de la discodermolida internamente es idéntica en los dos casos, excepto por el grupo amida que está girado 180 grados (ubicado hacia

el fondo del sitio). Además se puede observar que la estructura resultante del *docking* está un poco corrida hacia el sur del sitio interno de la proteína, debido a que el lazo inferior del sitio está más abierto. Esta diferencia puede deberse a que la modelización se llevó a cabo solo con la subunidad  $\beta$  de la tubulina, dándole más libertad conformacional a este lazo. De todos modos, este movimiento puede producirse fácilmente a temperatura ambiente, estando dentro del movimiento oscilatorio del lazo.



**Figura 38.** Comparación entre la conformación de unión obtenida mediante experimentos de *docking*-STD (verde) y de cristalografía (azul) de la discodermolida (**3**) unida a la subunidad  $\beta$  de tubulina en el sitio de paclitaxel.

## **2. Familia de pelorusido A.**

### **2.1. Caracterización químico-física de los compuestos.**

#### **2.1.1. Caracterización química.**

El pelorusido y la laulimalida representan dos agentes moduladores de microtúbulos, que se unen a tubulina y estabilizan dichos polímeros. Datos previos demuestran que tienen efecto sinérgico con paclitaxel y otros biomiméticos (como la discodermolida), en tubulina aislada (Hamel et al., 2006) y en células (Wilmes et al., 2007) (dato confirmado en el presente trabajo y mostrado anteriormente). Ambos compuestos son sustratos pobres para la gp-P y, por tanto, muestran actividad en células tumorales resistentes a fármacos (Pryor et al., 2002; Gaitanos et al., 2004). Además se demostró que se unen, o solapan entre ellos, en un sitio en el dímero de tubulina distinto al del paclitaxel (Pryor et al., 2002; Gaitanos et al., 2004), aunque todavía no se ha definido su localización. De todos modos, hay muchas informaciones disponibles relativas a la estructura-función de la laulimalida (Paterson et al., 2005; Ahmed et al., 2003), pero poco se conoce todavía acerca del pelorusido A (Hood et al., 2002).

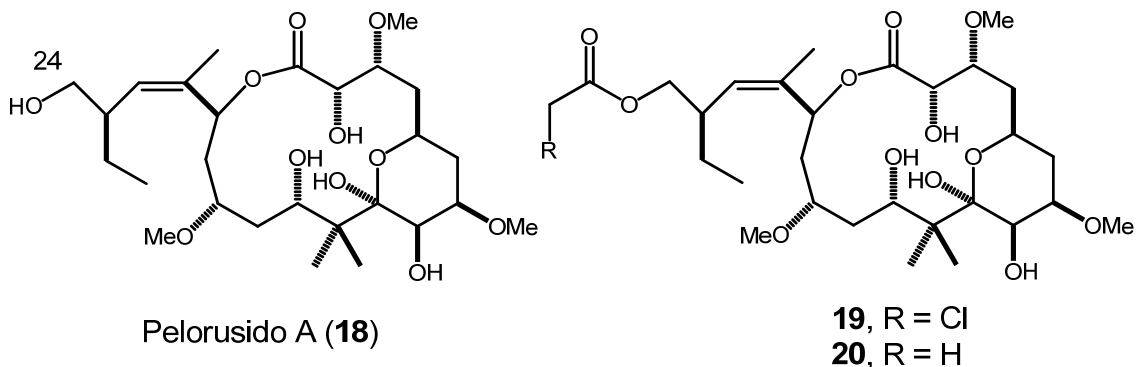
Por tanto, cualquier dato adicional con respecto a las características estereoquímicas o a qué grupos funcionales son esenciales para la actividad biológica del pelorusido A, puede ser de gran importancia en la caracterización de dicho compuesto y justificar dicha investigación.

Para ello, nos planteamos comprobar la diana celular del compuesto objeto de estudio, así como su efecto en células resistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P. Asimismo deseamos establecer la relación estructura-función de la interacción de pelorusido A a su diana, con el fin de conocer los determinantes estructurales que resultan en mejor afinidad y efectos celulares, así como buscar un marcaje covalente y determinar así el sitio de unión del ligando en examen.

Para la realización de este estudio, se recibieron en nuestro laboratorio tanto el compuesto pelorusido A (**18**) como dos análogos semisintéticos modificados en la posición C24: el 24-O-cloroacetil pelorusido (**19**) y el 24-O-



acetil pelorusido (**20**). La figura 39 muestra las estructuras de este grupo de moléculas.



**Figura 39.** Estructuras químicas de pelorusido A (**18**) y sus análogos semisintéticos modificados en la posición C24: 24-O-cloroacetil pelorusido (**19**) y 24-O-acetil pelorusido (**20**).

Con dichos análogos se pretendía evaluar la implicación de la posición C24 en la unión de la molécula a su sitio, con el fin de usarla como punto de anclaje de un grupo fluorescente, reactivo o radioactivo que permitiese emplear dicho análogo como sonda, profundizando así en la caracterización de las propiedades de unión del pelorusido A a su sitio.

La elección de dicha posición se basó puramente en criterios químicos. El alcohol primario en C24 era el más simple de modificar y por lo tanto, dada la escasez de datos de estructura-actividad del pelorusido A disponibles en aquel momento, representó el punto de partida para nuestra investigación.

La incorporación de un grupo electrofílico como el que se encuentra presente en el análogo **19** se basó en el hecho de que ligandos con este tipo de sustituyentes pueden reaccionar con residuos nucleofílicos de la proteína receptora, tales como los tioles de las cisteínas (Bai et al., 1996), estableciendo uniones covalentes. La formación de este complejo ligando-proteína permitió, tras experimentos de digestión y espectrometría de masas, identificar en qué residuos de la proteína se une el ligando (Buey et al., 2007). Esta información, junto con la disponible sobre la estructura de la tubulina, permitió en última

instancia modelar el sitio de unión del ligando, lo cual es de gran utilidad para la realización de un programa de diseño racionalizado de candidatos a fármacos.

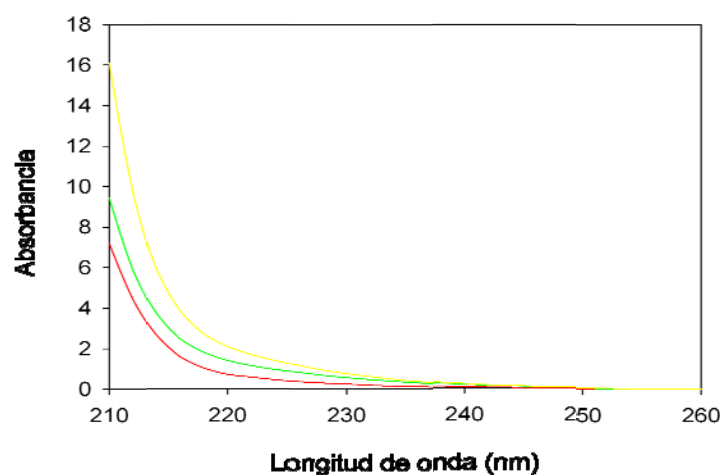
#### **2.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y caracterización espectrofotométrica en el ultravioleta-visible.**

Con el fin de detectar los compuestos en examen y obtener los parámetros espectroscópicos necesarios para el estudio de la interacción de los compuestos objeto de estudio con la tubulina, en primer lugar, se realizaron ensayos de cromatografía líquida de alta resolución.

La detección de los compuestos por HPLC se realizó en un cromatógrafo Agilent 1100, empleando una columna de fase reversa C18, en un sistema isocrático de dos pases: 10 min metanol/agua 60/40 (v/v) seguido por otro de 10 min metanol/agua 75/25 (v/v), empleando un flujo de 1ml/min.

La caracterización de los ligandos en examen se completó midiendo sus espectros de absorción en la zona del ultravioleta-visible (Figura 40).

A pesar de que ninguno de los compuestos analizados posee banda de absorción alguna, a partir de los 220 nm se observó un ligero aumento de la absorbancia para pelorusido A y sus dos análogos.



**Figura 40.** Espectros de absorción en el ultravioleta-visible de: pelorusido A (línea roja), 24-O-cloroacetil pelorusido (línea verde) y 24-O-acetil pelorusido (línea amarilla). Se muestra el espectro de absorción promedio de un total de tres medidas independientes. Precisión de la pesada 1  $\mu$ g.

## 2.2. Efectos de los ligandos en células.

### 2.2.1. Citotoxicidad.

Con el objeto de estudiar la actividad biológica de los ligandos **19** y **20** y comprobar su efecto citotóxico en células, se procedió a determinar su CI<sub>50</sub> en células humanas de carcinoma de ovario A2780 y A2780AD (multirresistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P), en comparación con el compuesto de referencia (**18**) y el paclitaxel.

En la tabla 20 se muestran los valores obtenidos para cada ligando.

En las condiciones experimentales probadas, en las células A2780, los dos análogos del pelorusido A resultaron ser citotóxicos, siendo el compuesto **19** unas 10 veces más activo que el análogo **20** (IC<sub>50</sub> 26.6 nM y 256.6 nM, respectivamente). El pelorusido A mantuvo su actividad citotóxica en estas líneas celulares, tal y como se describió años atrás (Gaitanos et al., 2004).

En la línea A2780AD la actividad de los compuestos estudiados resultó ser bastante menos potente que en las células A2780 (lo mismo se confirmó para el ligando parental). De todas formas, los índices de resistencia de los agentes de la familia de pelorusido fueron muchos más bajos que aquél del

paclitaxel y, como consecuencia, dichos compuestos vencieron la resistencia a fármacos que confiere la gp-P.

Compuesto	A2780 (nM)	A2780AD (nM)	R/S
<b>Paclitaxel</b>	1.6 ± 0.7	1100 ± 50	687.5
<b>18</b>	19.2 ± 0.7	880 ± 100	45.8
<b>19</b>	26.6 ± 1.8	2950 ± 450	110.9
<b>20</b>	256.6 ± 0.2	3100 ± 70	12.1

**Tabla 20.** Citotoxicidad de los ligandos de la familia de pelorusido A en células de carcinoma de ovario sensibles (A2780) y multirresistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P (A2780AD) incubadas durante 48 horas. Los datos representan la media (± errores estándar) de al menos cuatro experimentos diferentes. R/S representa el índice de resistencia de la línea A2780AD, obtenido dividiendo la CI50 de la línea resistente por la CI50 de la línea sensible.

Se concluyó, por tanto, que los análogos del pelorusido A mostraron efecto citotóxico a nivel celular, de la misma manera que la molécula parental.

### **2.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.**

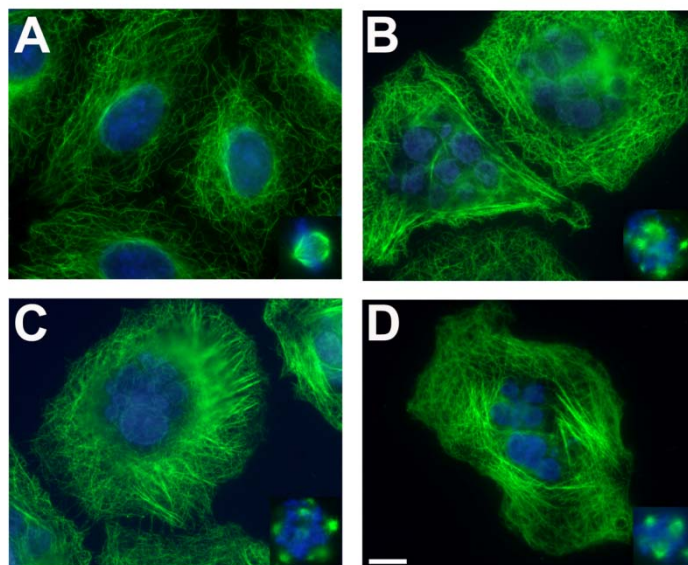
Una vez comprobada la actividad citotóxica de los ligandos de la familia de pelorusido A, con el fin de evaluar su actividad a nivel del citoesqueleto, se decidió estudiar el efecto de dichas moléculas sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear.

Para ello, se estudió la red de microtúbulos y la morfología nuclear de células humanas de carcinoma de pulmón A549 incubadas durante 24 horas en presencia del compuesto **18** y de sus dos análogos **19** y **20**.

Las células, después del tratamiento tanto con el ligando **19** como con el **20**, presentaron haces de microtúbulos, mitosis aberrantes (ásteres múltiples) y células interfásicas micronucleadas (Figura 41 B, C y D).

Este resultado puso de manifiesto que, en la línea celular ensayada, los dos análogos estudiados se comportaron como agentes estabilizantes de

microtúbulos. Se confirmó también el mismo efecto del pelorusido A (**18**) en células (Hood et al., 2002).



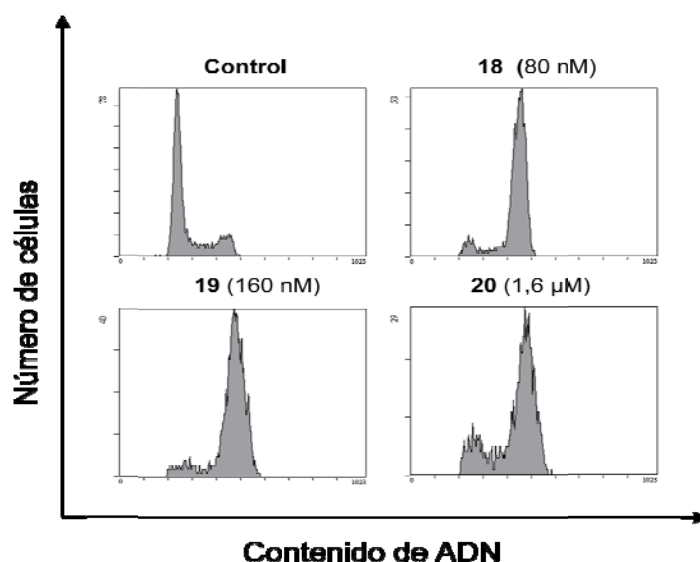
**Figura 41.** Efecto de los análogos **19** y **20** en los microtúbulos y en la morfología nuclear de células humanas de carcinoma de pulmón A549. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSO (A), **18** 1  $\mu$ M (B), **19** 1  $\mu$ M (C) y **20** 10  $\mu$ M (D). Los microtúbulos (verdes) se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina, mientras que el ADN (azul) se marcó con Hoechst 33342. Las inserciones (abajo a la derecha de cada imagen) muestran los husos mitóticos de las mismas preparaciones. La barra (D) representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento.

### 2.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.

Con el propósito de corroborar la capacidad estabilizante de microtúbulos de los compuestos en examen, revelada por los ensayos de inmunofluorescencia, se realizaron estudios sobre el ciclo celular.

Para ello, se incubaron las células de carcinoma de pulmón A549 durante 20 horas en presencia de los ligandos **18**, **19** y **20**, y se analizaron los cambios durante el ciclo celular determinando el contenido de ADN mediante la técnica de citometría de flujo (Figura 42), y así obtener el porcentaje de células en cada fase del ciclo (Tabla 21).

A diferencia del control, en todas las células tratadas se detectó una acumulación de más del 70 % de las células en la fase G<sub>2</sub>/M, siendo el ligando **18** la molécula más activa. El compuesto menos activo fue el análogo **20**.



**Figura 42.** Efecto sobre el ciclo celular en células humanas de carcinoma de pulmón A549, incubadas durante 20 horas en presencia de pelorusido A y los análogos **19** y **20**. Control: células sin tratar. Se muestra la concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.

Compuesto	% G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% S	% G <sub>2</sub> /M
Control	65.4	16.76	17.84
<b>18</b> 80 nM	11.06	10.98	77.96
<b>19</b> 160 nM	11.3	13.56	75.14
<b>20</b> 1.6 μM	19.1	9.94	70.96

**Tabla 21.** Porcentajes de células A549 en cada fase del ciclo celular tras la incubación de 20 horas en presencia de la concentración más pequeña de ligandos **18**, **19** y **20** que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M.

El ensayo empleado confirmó, por tanto, que el proceso de mitosis representaba la diana biológica de los compuestos ensayados, así como la actividad estabilizadora de dichos agentes.

## **2.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.**

### **2.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.**

#### **2.3.1.1. Ensamblaje en ausencia y presencia de glicerol.**

Los agentes estabilizantes de microtúbulos más potentes son capaces de promover el ensamblaje de tubulina bajo condiciones generalmente hostiles (Díaz et al., 1993). Para confirmar los resultados celulares y, por tanto la naturaleza estabilizante de los compuestos en examen, se llevó a cabo la determinación de la concentración crítica (Cr) de la tubulina en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos, en el tampón PEDTA4-1 mM GTP. Se incubaron las muestras durante 30 min a 37 °C y se centrifugaron tal y como se ha detallado en Materiales y métodos. Posteriormente, se tomaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados. La concentración de tubulina en los sobrenadantes y en los sedimentos se determinó utilizando el método Bradford.

Los resultados pusieron de manifestó que el pelorusido A fue capaz de inducir el ensamblaje de tubulina (Cr 3.1  $\mu$ M). Por el contrario, en las mismas condiciones experimentales, ninguno de los dos análogos de la familia de pelorusido A (**19** y **20**) fue capaz de inducir el ensamblaje de tubulina (datos no mostrados). Paclitaxel y docetaxel, cuyas concentraciones críticas fueron 5.4  $\mu$ M y 1.5  $\mu$ M respectivamente, se utilizaron como controles.

Como consecuencia del resultado anterior, el siguiente paso fue examinar si los compuestos **19** y **20** eran al menos débiles agentes estabilizantes de microtúbulos, capaces de promover el ensamblaje del polímero bajo condiciones (GAB-1 mM GTP pH 6.5) en las cuales la tubulina misma es capaz de ensamblar, a 37 °C, en ausencia de ligando (Cr de  $3.3 \pm 0.02$   $\mu$ M) (Buey et al., 2005).

En estas circunstancias, el paclitaxel, el docetaxel y el pelorusido A estabilizaron fuertemente los microtúbulos disminuyendo la Cr de la tubulina a  $0.38 \pm 0.06$   $\mu$ M,  $0.26 \pm 0.05$   $\mu$ M y  $0.24 \pm 0.09$   $\mu$ M, respectivamente. Este resultado indicó la misma potencia estabilizante de los taxanos para el pelorusido A. En cambio, los derivados esterificados estudiados (**19** y **20**) no promovieron una significativa estabilización de los microtúbulos (Cr en ambos

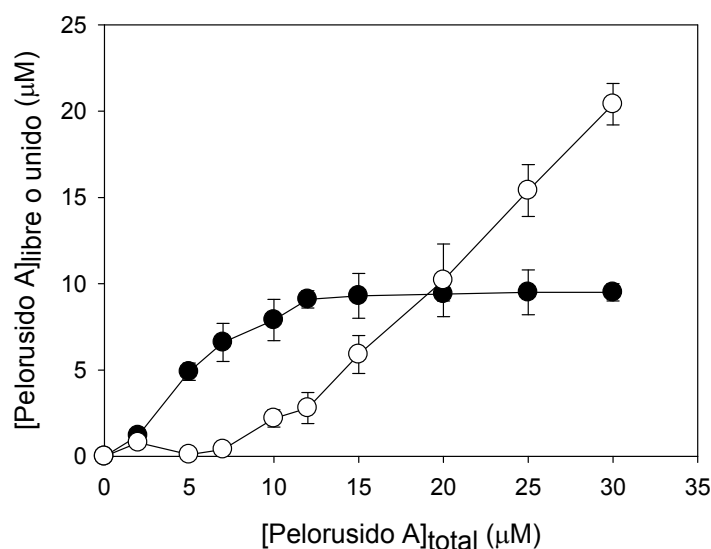
casos:  $3.3 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ), lo que demostró que *in vitro* no exhibían actividad de este tipo alguna.

## 2.4. Determinación de la unión de los compuestos a microtúbulos.

### 2.4.1. Estequiometría de unión de los compuestos a microtúbulos estabilizados y nativos.

Se determinó la estequiometría de unión del pelorusido A a microtúbulos estabilizados incubándose para ello a  $25^\circ\text{C}$ , en tampón GAB-0.1 mM GTP, un total de  $10 \mu\text{M}$  de estos polímeros en presencia de concentraciones crecientes de ligando. Después de la incubación, se centrifugó la muestra, se extrajo el compuesto de ambas fases y se cuantificó por HPLC empleando el docetaxel como estándar interno, tal y como se ha descrito en Materiales y métodos. El compuesto libre permaneció en el sobrenadante, mientras que el unido se halló en el sedimento, donde se encontraron los microtúbulos.

El pelorusido A se unió a los microtúbulos estabilizados con una estequiometría de  $0.95 \pm 0.06$  moléculas de ligando por sitio de paclitaxel (Figura 43).



**Figura 43.** Cosedimentación de pelorusido A con  $10 \mu\text{M}$  de microtúbulos estabilizados. Círculos negros: compuesto unido. Círculos blancos: compuesto libre. Se representa la media y el error estándar de un total de tres experimentos independientes.



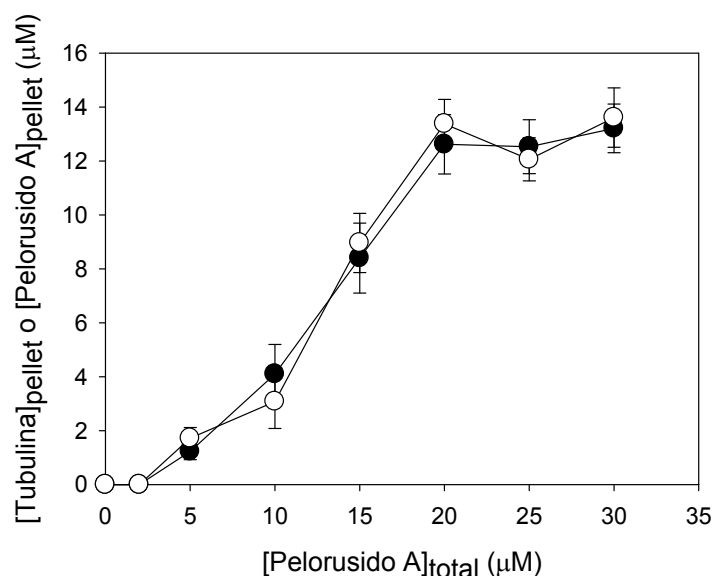
Estos resultados revelaron que el sitio de unión del pelorusido se preservó en los microtúbulos estabilizados, y que dicho ligando presentó una relación 1:1 con el dímero de tubulina, como ocurre para los agentes estabilizantes de microtúbulos que se unen al sitio de paclitaxel (Buey et al., 2007).

Los análogos **19** y **20** no se detectaron en la fracción de los microtúbulos y permanecieron íntegramente en el sobrenatante, revelando su falta de unión covalente a los microtúbulos estabilizados (datos no mostrados).

Una vez constatado que pelorusido A se unía a microtúbulos estabilizados, se probó su unión a microtúbulos inducidos por ligando.

Para ello, se determinó la estequiometría de unión del compuesto a microtúbulos nativos bajo condiciones en las cuales se previene el ensamblaje de tubulina. Un total de 14  $\mu\text{M}$  de tubulina se incubó a 37 °C, en tampón PEDTA6-1 mM GTP, en presencia de concentraciones crecientes de ligando. Se procesaron las muestras y determinaron las concentraciones de compuesto tal y como ya se ha descrito, y la concentración de tubulina se determinó mediante el método de Bradford usando un estándar de tubulina.

En las condiciones experimentales empleadas, el pelorusido A mostró el ensamblaje de tubulina con una estequiometría de unión de  $1.04 \pm 0.08$  moléculas de pelorusido A por dímero de tubulina (Figura 44).



**Figura 44.** Cosedimentación de pelorusido A con 14 μM de tubulina. Círculos negros: tubulina. Círculos blancos: compuesto. Se representa la media y el error estándar de un total de tres experimentos independientes.

Sin embargo, en presencia de los dos análogos **19** y **20** no se produjo ensamblaje de tubulina y, al igual que ocurre con los microtúbulos estabilizados, dichos ligandos no se detectaron en la fracción de los microtúbulos (datos no mostrados), lo que descartó su unión a éstos polímeros.

#### **2.4.2. Medida de las constantes de unión de los ligandos a microtúbulos estabilizados: desplazamiento de flutax-2.**

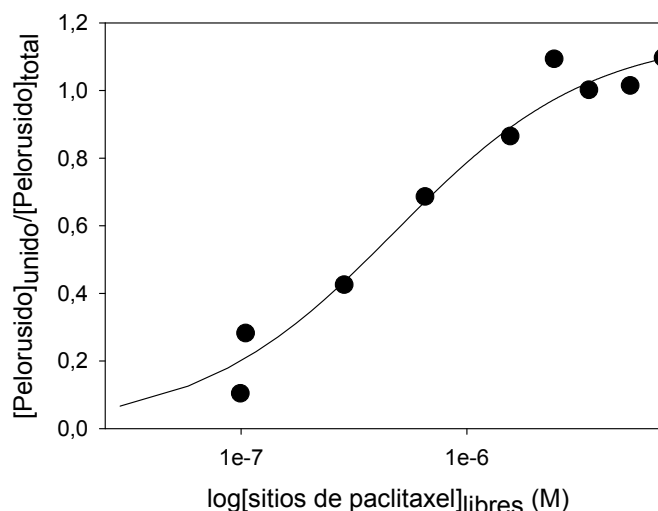
Con el fin de caracterizar la unión del pelorusido A a microtúbulos estabilizados, se llevó a cabo la determinación de sus constantes de unión a distintas temperaturas, realizándose titulaciones de sitios de paclitaxel a concentraciones fijas de compuesto y procediéndose tal y como se ha descrito en Materiales y métodos.

La tabla 22 recoge las constantes de unión del compuesto estudiado.

El pelorusido A se unió a los microtúbulos estabilizados con una afinidad del orden de μM (Figura 45).

Compuesto	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C
Pelorusido A	0.35 ± 0.1	0.32 ± 0.1	0.24 ± 0.1	0.26 ± 0.05	0.21 ± 0.03

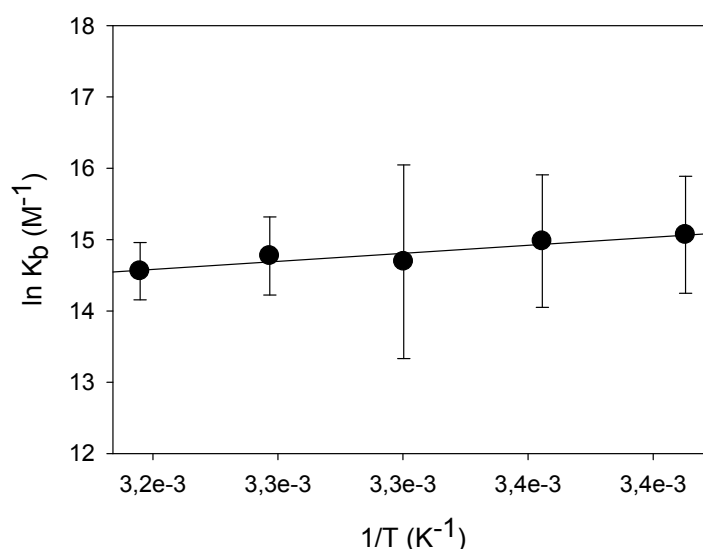
**Tabla 22.** Constantes de unión del pelorusido A a microtúbulos estabilizados medidas por desplazamiento de flutax-2 a diferentes temperaturas ( $10^7 \text{ M}^{-1}$ ). Se muestra el valor medio y el error estándar de un total de tres experimentos independientes.



**Figura 45.** Isotherma de unión de 0.5  $\mu\text{M}$  de pelorusido A con microtúbulos estabilizados a 25 °C.

Una vez conocidas las constantes de unión de los compuestos a su sitio, fue posible calcular el cambio de energía libre ( $\Delta G$ ), así como el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) y la variación de entropía ( $\Delta S$ ), tal y como se ha detallado en los párrafos 1.5.1.1. y 1.5.1.2. de este apartado de Resultados, respectivamente.

La figura 46 muestra la representación de Van't Hoff del proceso de unión del pelorusido A.



**Figura 46.** Representación de Van't Hoff del proceso de unión del pelorusido A a microtúbulos estabilizados. Se muestra el valor medio y el error estándar de un total de tres experimentos independientes.

Los parámetros termodinámicos de la unión del pelorusido A a su sitio son termodinámicamente favorables, como se muestra en la tabla 23.

Compuesto	$\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S$ (J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G$ 35 °C (kJ mol <sup>-1</sup> )
Pelorusido A	-18.7 ± 4.3	61.4 ± 14.1	-37.8 ± 0.5

**Tabla 23.** Parámetros termodinámicos del proceso de unión del pelorusido A a su sitio. Se muestra el valor medio y el error estándar de un total de tres experimentos independientes.

## 2.5. Hidrólisis del análogo 19 en el medio de cultivo celular.

Para explicar la actividad biológica de los análogos en examen puesta de manifiesto en los ensayos celulares, opuesta a la ausencia de actividad detectada en los ensayos bioquímicos, se pensó que los compuestos podrían estar sufriendo un proceso de hidrólisis en el medio de cultivo o en el interior celular, proceso que ya se había observado años atrás en el estudio del compuesto 2-acetil-flutax (Jiménez-Barbero et al., 1998).

Para ello, se incubó 1  $\mu\text{M}$  del compuesto más activo, el análogo **19**, durante 24 horas en medio de cultivo en presencia y en ausencia de células A549. A continuación, se recuperaron las células con PBS-EDTA, se centrifugaron previo lavado con PBS y se lisaron. Dicho lisado y el medio de cultivo de las muestras con y sin células se liofilizó. Se extrajeron los compuestos orgánicos de los tres tipos de muestras con metanol y se analizaron finalmente por HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Figura 47).

En las muestras de lisado celular no se detectó ninguno de los dos compuestos. Sin embargo, el análisis de las muestras de medio de cultivo reveló que el análogo en cuestión fue hidrolizado a pelorusido A, puesto que después de la incubación no se detectó dicho análogo pero sí el aducto sódico del pelorusido A.

**Figura 47.** Hidrólisis del análogo **19** en el medio de cultivo celular. **A:** Análisis de una solución estándar: 50  $\mu\text{M}$  de pelorusido A y 50  $\mu\text{M}$  de ligando **19**. Los pesos moleculares corresponden a las especies monoprotonadas con una molécula de sodio. **B:** Análisis de una muestra de cultivo celular preincubada 24 horas con 1  $\mu\text{M}$  de análogo **19** (línea sólida) o la misma proporción de DMSO (línea discontinua).

Como puede observarse en la tabla 24, el pelorusido A se detectó en todas las muestras tratadas con el análogo **19**, independientemente de la presencia o no de células, de modo que la hidrólisis tiene lugar en el medio de cultivo celular.

Como consecuencia, los análogos de pelorusido A tienen efecto solo a nivel celular.

Muestra	Tiempo de retención (min)	Señal detectada (m/z)	Especie	Intensidad relativa (u.a.)
- Células	7.13	571.31	[M+Na] <sup>+</sup>	100.00
+ Pelorusido A		587.22	[M+K] <sup>+</sup>	2.27
- Células	7.07	571.32	[M+Na] <sup>+</sup>	100
+ análogo 19		587.18	[M+K] <sup>+</sup>	1.1
+ Células	7.24	571.33	[M+Na] <sup>+</sup>	100
+ Pelorusido A		587.29	[M+K] <sup>+</sup>	6.49
+ Células	7.15	571.38	[M+Na] <sup>+</sup>	100
+ análogo 19				

**Tabla 24.** Detección de los aductos sódico y potásico de pelorusido A por HPLC-MS presentes en todas las muestras de cultivo celular incubadas con pelorusido A o su análogo **19**, en presencia o en ausencia de células.

## 2.6. Estructura de microtúbulos inducidos por ligandos.

### 2.6.1. Determinación del diámetro de los microtúbulos: SAXS.

Con el fin de profundizar en el estudio del modo de acción del pelorusido A, se midieron los perfiles de dispersión de muestras de microtúbulos ensamblados en presencia de paclitaxel, docetaxel y pelorusido A, cuyos perfiles se confrontaron con aquellos obtenidos a partir de muestras de microtúbulos ensamblados en ausencia de compuesto, tal y como se ha descrito en el Materiales y métodos.

En comparación con los resultados obtenidos en presencia de paclitaxel y docetaxel, la unión de pelorusido A a los microtúbulos produjo una alteración más evidente, reduciendo el número medio de protofilamentos en 1.2 con respecto al control (DMSO) (Tabla 25).

Compuesto	$J_{01}$ (nm <sup>-1</sup> )	$J_{02}$ (nm <sup>-1</sup> )	Media del radio (nm)	n° de protofilamentos
DMSO	0.049	0.091	12.53	13.6
Paclitaxel <sup>a</sup>	0.052	0.099	11.51	12.7
Docetaxel <sup>b</sup>	0.049	0.090	12.45	13.7
Pelorusido A	0.054	0.101	11.04	12.4

**Tabla 25.** Posiciones de los máximos de la función de dispersión de rayos X en disolución de los microtúbulos inducidos en ausencia o presencia de paclitaxel, docetaxel y pelorusido A. Los radios helicoidales de los microtúbulos (expresados en nm) y el número de protofilamentos se calcularon por interpolación, usando los resultados previamente descritos (Andreu et al., 1992; Andreu et al., 1994; Díaz et al., 1994). Las desviaciones de la posición de los máximos de  $J_0$  son típicamente de 0.001 nm<sup>-1</sup>. <sup>a</sup> (Andreu et al., 1992). <sup>b</sup> (Andreu et al., 1994).

Así pues, la presencia del pelorusido A modifica el número de protofilamentos y por tanto el diámetro de los microtúbulos.

## 2.7. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a tubulina y microtúbulos.

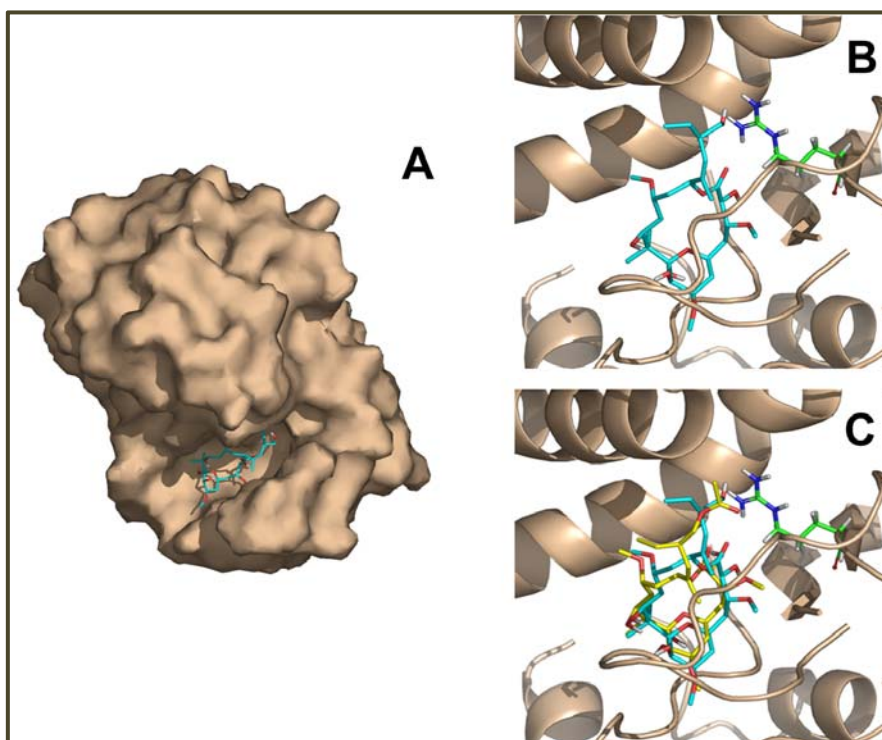
### 2.7.1. RMN y modelado molecular.

El distinto comportamiento del pelorusido A y de sus dos análogos se estudió mediante técnicas de modelado molecular en el laboratorio del profesor Vilarrasa, en la Universidad de Barcelona.

Se realizaron estudios de *docking* de los ligandos en el sitio propuesto en la subunidad  $\alpha$ -tubulina (Pineda et al., 2004; Jiménez-Barbero et al., 2006), bajo el loop B9-B10, así como en el sitio propuesto en la subunidad  $\beta$ -tubulina (Huzil et al., 2008; Bennett et al., 2010; Kanakkanthara et al., 2011).

Inicialmente se pensó que los tres compuestos podían unirse preferentemente al sitio en  $\alpha$ -tubulina adoptando una conformación similar a una previamente publicada (Jiménez-Barbero et al., 2006) (Figura 48, A). Sin embargo, en los complejos resultantes, el grupo alcohol en la posición C24 formó un puente de hidrógeno con el residuo de Arg320 (Figura 48, B) que, como se esperaba, se perdió en el caso de los compuestos esterificados **19** y

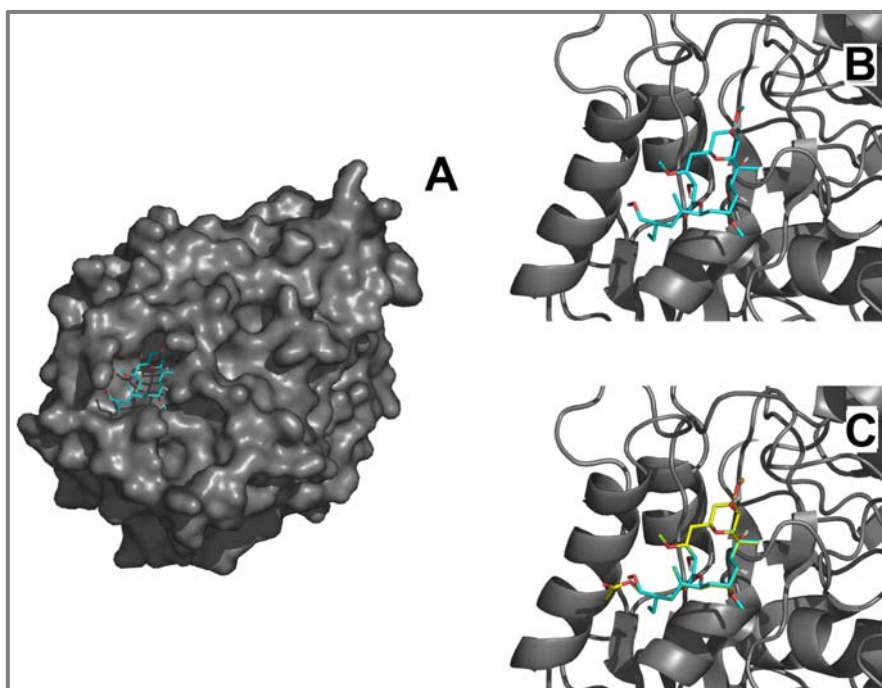
**20.** Dicha interacción no fue la única que se perdió en los análogos, sino que el efecto estérico del acetilo y cloroacetilo parecieron distorsionar el complejo resultante, de manera que las interacciones restantes de pelorusido se debilitaron o incluso no llegaron a crearse (Figura 48, C).



**Figura 48.** Estudio de *docking* del pelorusido A y de sus análogos **19** y **20** en el sitio propuesto en  $\alpha$ -tubulina. **A:** Vista general de la subunidad  $\alpha$ -tubulina con el pelorusido A unido. **B:** Detalle del modo de unión del pelorusido A. **C:** Efecto de la acetilación de la posición C24 en el modo de unión del pelorusido A. El pelorusido A se muestra en azul y rojo, el análogo **20** se muestra en amarillo y rojo y la Arg320 en verde y azul marino.

Adicionalmente se llevaron a cabo simulaciones de ajuste molecular de los tres compuestos de la familia de pelorusido A en el sitio de unión propuesto en la subunidad  $\beta$ -tubulina (Huzil et al., 2008; Bennett et al., 2010). Para este supuesto, las simulaciones predijeron que el pelorusido A y sus dos análogos semisintéticos se unían a dicho sitio de manera similar al predicho para el sitio en  $\alpha$ -tubulina, de modo que deberían poseer su actividad estabilizante de microtúbulos (Figura 49).



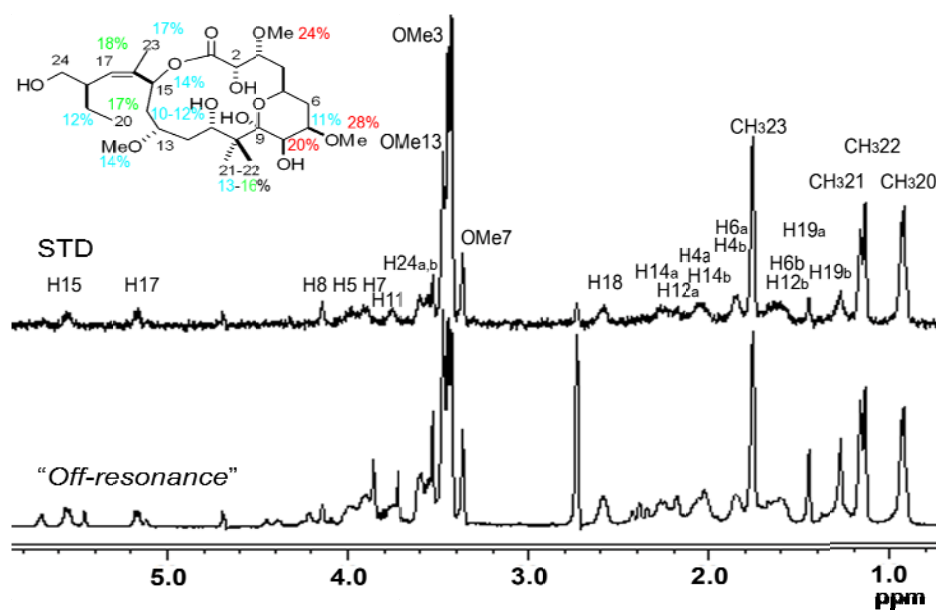


**Figura 49.** Estudio de *docking* del pelorusido A y de sus análogos **19** y **20** en el sitio propuesto en  $\beta$ -tubulina. **A:** Vista general de la subunidad  $\beta$  con el pelorusido A unido. **B:** Detalle del modo de unión del pelorusido A. **C:** Efecto de la acetilación de la posición C24 en el modo de unión del pelorusido A. El pelorusido A se muestra en azul y rojo y el análogo **20** en amarillo y rojo.

### 2.7.2. Epítopos de unión del pelorusido A unido a microtúbulos estabilizados.

Para determinar los protones del pelorusido A próximos a la tubulina cuando la molécula estaba unida a su sitio, se llevó a cabo un espectro STD de la molécula unida a microtúbulos estabilizados.

Los protones con mayor grado de saturación resultaron ser los de las posiciones C8, C17, C3, C13, C20 y C22 (Figura 50), situados tanto en regiones de la cadena lateral como en grupos metilo presentes en el macro ciclo.



**Figura 50.** Espectros de “Off-resonance” y STD del pelorusido A unido a microtúbulos estabilizados. Se marcan los protones con señal STD. Se muestra en la estructura del pelorusido A con el porcentaje de saturación de los protones marcándose en rojo, verde y azul de mayor a menor saturación, respectivamente.

## **Caracterización de la interacción de compuestos desestabilizantes con tubulina y microtúbulos.**

### **3. Familia de pironetina.**

#### **3.1. Caracterización químico-física de los compuestos.**

##### **3.1.1. Caracterización química.**

La idea central del proyecto de esta investigación fue la concepción, diseño y síntesis de estructuras orgánicas no naturales, pero emparentadas con las mismas, que muestren interacciones importantes con proteínas clave de las células del organismo humano, en este caso la  $\alpha$ -tubulina. La idea de este estudio fue reforzada por el hasta ahora muy bajo número de compuestos descritos que exhiben interacción con dicha diana biológica, tal y como se ha descrito en Introducción. El objetivo es conseguir estructuras que muestren una actividad biológica mejorada o, al menos, razonablemente similar a la del producto natural del que derivan pero con una estructura más sencilla, que haga más viable y económica su síntesis.

Se ha seleccionado la proteína  $\alpha$ -tubulina por su papel clave en la constitución estructural y en la dinámica de los microtúbulos de las células eucariotas. Cualquier principio activo que exhiba una interacción relevante con dichas tubulinas influirá en la dinámica de la formación del huso mitótico y, por consiguiente, en el proceso de división celular. Dado que la característica principal de todos los tipos de cáncer descritos es que en ellos se halla completamente descontrolado el proceso de división celular, cabe concluir que cualquier principio activo que interaccione de manera relevante con las tubulinas puede resultar de utilidad en la lucha terapéutica contra el cáncer.

Son aún muy escasos, apenas un par los de origen natural (Kobayashi et al., 1994a-b; Usui et al., 2004a; Talpir et al., 1994; Coleman et al., 1995) y muy pocos más los de origen sintético (Uckun et al., 2001), los que lo hacen con la  $\alpha$ -tubulina, lo que convierte a ésta en una diana novedosa de interés terapéutico.

Las estructuras elegidas para dicho estudio se sintetizaron a partir de uno de los pocos productos naturales que exhibió dicha característica, la pironetina.

Trabajos previos sugieren la importancia del doble enlace conjugado entre C2 y C3 para la actividad de la pironetina, así como de un oxígeno unido al carbono en C9 y de un hidroxilo libre en C7 (Yasui et al., 1995; Kondoh et al., 1998; Kondoh et al., 1998). No se tienen por ahora datos acerca de la necesidad del enlace doble C12-C13 ni tampoco de la de los restos alquilo (metilo, etilo) que adornan, a la par que complican, la estructura. Además se ha establecido la actividad desestabilizante de dicha molécula y también la utilidad en la terapia antitumoral para vencer la resistencia a medicamentos en ciertos tipos de líneas tumorales (Yoshida et al., 2007).

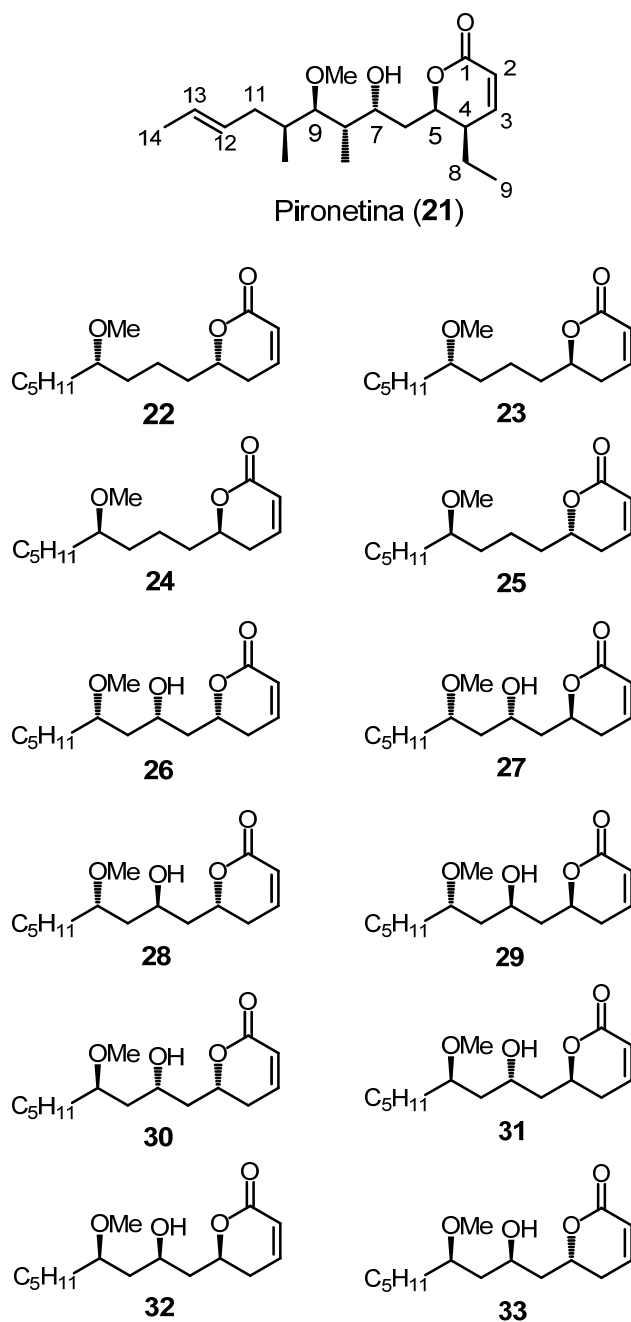
Para ello, nos planteamos llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad y establecer así qué elementos estructurales farmacofóricos son esenciales para que se den interacciones con  $\alpha$ -tubulina. Asimismo deseamos comprobar su citotoxicidad y el efecto en células resistentes a quimioterapia por sobreexpresión de la glicoproteína-P.

Para la realización de este trabajo, contamos con la pironetina (**21**), y dos grupos de análogos caracterizados por estructuras más sencillas (**22**, **23**, **24**, **25**, **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31**, **32** y **33**) (Figura 51).

Dichos análogos conservaron al menos los elementos estructurales mínimos que hasta ahora se había descrito como importantes o decisivos en la aparición de la actividad biológica del compuesto **21** (Usui et al., 2004a; Watanabe et al., 2000). Como se ha descrito anteriormente, éstos fueron el doble enlace entre C2 y C3, la función oxigenada (alcohol o éter) en C9 y un hidroxilo libre en C7 con la configuración *R*. Dado que el hidroxilo en C9, estuviera o no libre, no influía en la acción sobre los microtúbulos (Watanabe et al., 2000; Yasui et al., 1995; Kondoh et al., 1998; Kondoh et al., 1999), se sintetizaron compuestos con dicho hidroxilo metilado como en el producto natural.

El primer grupo de análogos, que exhibió los elementos mínimos previamente mencionados a excepción del grupo hidroxilo en posición C7, fue representado por los cuatro estereoisómeros **22**, **23**, **24** y **25**.

El segundo grupo, que además contenía como elemento estructural adicional el hidroxilo en C7, se constituyó por los ocho estereoisómeros **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33**.



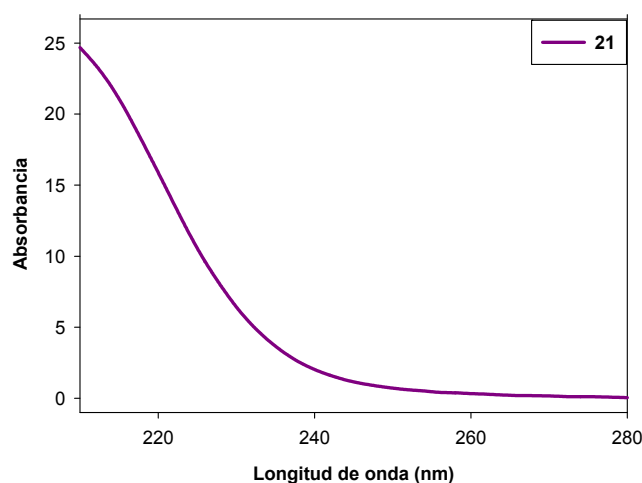
**Figura 51.** Estructuras químicas de pironetina (**21**) y sus análogos simplificados.

### 3.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y caracterización espectrofotométrica en el ultravioleta-visible.

Con el fin de detectar los compuestos y obtener los parámetros espectroscópicos necesarios para el estudio de la interacción de dichos ligandos con la tubulina, en primer lugar se realizaron ensayos de cromatografía líquida de alta resolución.

La detección de los compuestos por HPLC se realizó en un cromatógrafo Agilent 1100 empleando una columna de fase reversa C18, gradiente de acetonitrilo en agua del 50 al 80 % y 1 ml/min de flujo durante 30 minutos a una  $\lambda = 230$  nm.

Finalmente, la caracterización de los ligandos en examen se completó midiendo sus espectros de absorción en la zona del ultravioleta-visible. La figura 52 muestra el espectro de absorción del compuesto parental de la familia en estudio; los demás derivados caracterizados se comportaron de la misma manera que la molécula base.



**Figura 52.** Espectros de absorción en el ultravioleta-visible de la pironetina. Se muestra el espectro de absorción promediado de un total de tres medidas independientes realizadas en metanol grado espectroscopia y a 25 °C.

### **3.2. Efectos de los ligandos en células.**

#### **3.2.1. Citotoxicidad.**

Con el fin de estudiar la actividad biológica de los análogos de pironetina en examen y comprobar si el efecto citotóxico en células es comparable a lo de la molécula parental, se empleó el ensayo de MTT, tal y como se ha descrito en Materiales y métodos.

Se determinaron los valores de CI50 de todos los análogos simplificados (**22-33**), utilizando células humanas de carcinoma de ovario sensibles (A2780) y multiresistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P (A2780AD) incubadas en presencia de los compuestos durante 48 horas.

En las condiciones experimentales ensayadas, la pironetina mostró una elevada actividad citotóxica en ambas líneas celulares (CI50 3 nM). Los efectos obtenidos en presencia de los análogos en examen mostraron resultados muy similares entre sí en las dos líneas empleadas. En comparación con la molécula de referencia, dichos análogos exhibieron su efecto en un rango  $\mu\text{M}$  (a una concentración 5-18 y 3-16  $\times 10^3$  veces superior en A2780 y A2780AD, respectivamente) (Tabla 26).

Los índices de resistencia (R/S) mostraron valores muy parecidos al de la pironetina, aunque realmente dichos resultados fueron debidos a las altas concentraciones de ligandos empleadas en el ensayo.

Compuesto	A2780 ( $\mu\text{M}$ )	A2780AD ( $\mu\text{M}$ )	R/S
<b>Paclitaxel</b>	$0.00082 \pm 0.0002$	$0.949 \pm 0.38$	1157
<b>Pironeína</b>	$0.0029 \pm 0.001$	$0.003 \pm 0.0002$	1
<b>22</b>	$20.6 \pm 2.4$	$9 \pm 3.2$	0.45
<b>23</b>	$14.9 \pm 1.3$	$11.5 \pm 1.3$	0.77
<b>24</b>	$14.4 \pm 3.2$	$20.49 \pm 5$	1.42
<b>25</b>	$17.1 \pm 5$	$12.2 \pm 1.9$	0.7
<b>26</b>	$53.7 \pm 3$	$48 \pm 0.01$	0.89
<b>27</b>	$35.4 \pm 6.3$	$26.3 \pm 4$	0.74
<b>28</b>	$33.7 \pm 9$	$25.2 \pm 0.86$	0.74
<b>29</b>	$49.4 \pm 3.4$	$46.3 \pm 6.8$	0.93
<b>30</b>	$44 \pm 2.8$	$57.5 \pm 0.35$	1.3
<b>31</b>	$22.9 \pm 4.4$	$30 \pm 1.3$	1.3
<b>32</b>	$54.5 \pm 6$	$91.5 \pm 23.6$	1.67
<b>33</b>	$28.9 \pm 7$	$18.1 \pm 3.2$	0.62

**Tabla 26.** Citotoxicidad de los análogos **22-33** de la familia de pironeína en células de carcinoma de ovario sensibles (A2780) y multiresistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P (A2780AD) incubadas en presencia de estos compuestos durante 48 horas. Los datos representan la media ( $\pm$  errores estándar) de dos experimentos diferentes cada uno por duplicado. R/S representa el índice de resistencia de la línea A2780AD, obtenido dividiendo la CI50 de la línea resistente por la CI50 de la línea sensible.

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se pudo concluir que los análogos objeto de estudio mostraron capacidad citotóxica en las condiciones experimentales ensayadas, aunque de forma menos potente que la molécula de referencia.

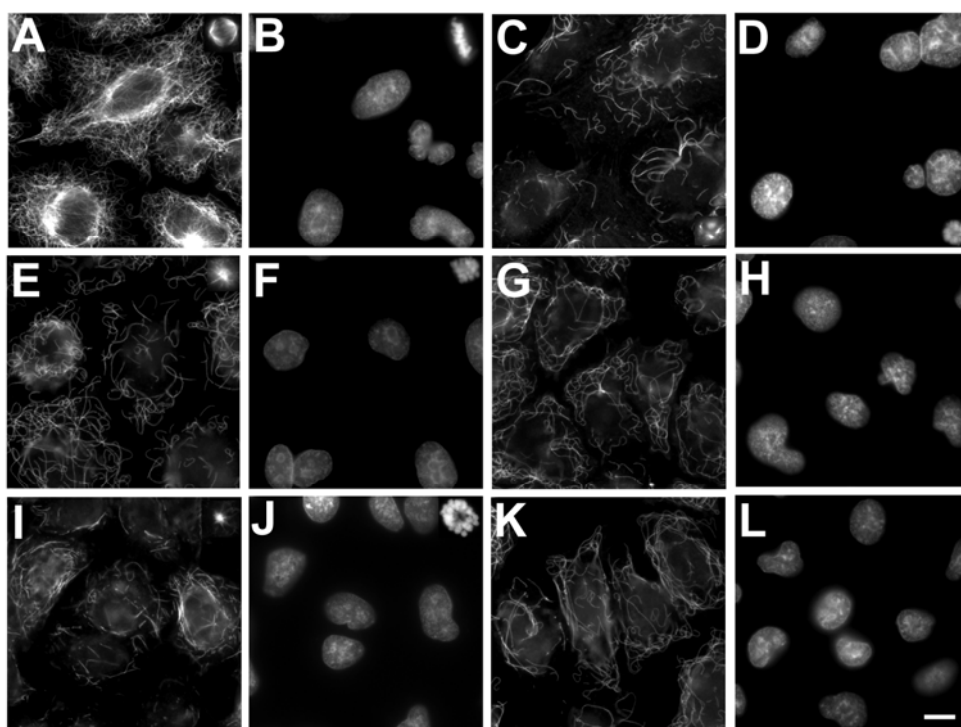
### **3.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.**

Con el fin de establecer si los dos grupos de análogos sintetizados actúan a nivel del citoesqueleto, despolimerizando los microtúbulos de la misma manera que la molécula parental (Kondoh et al., 1998; Kondoh et al., 1999), se estudió el efecto de dichos compuestos sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear.



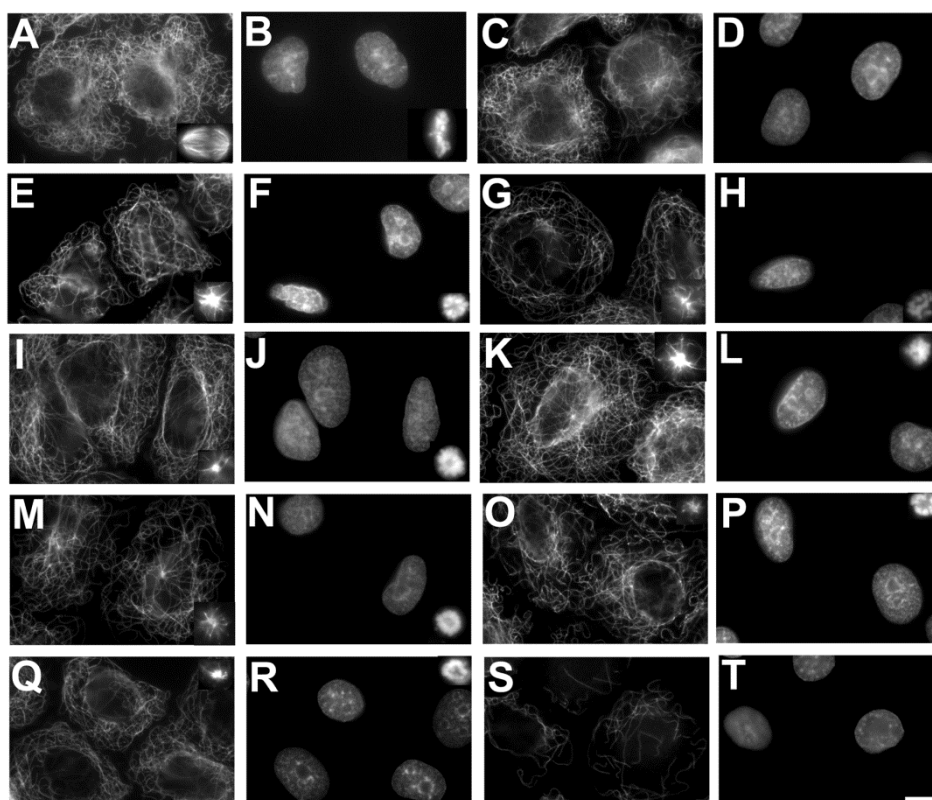
Para ello, se emplearon células humanas de carcinoma de pulmón A549 incubadas durante 4 o 24 horas (Figuras 53 y 54, respectivamente) en presencia de distintas concentraciones de ligando. Se permeabilizaron las células con Triton X-100 y se fijaron con formaldehído al 3.7 %, como se ha descrito en Materiales y métodos.

Las inmunofluorescencias mostraron que la pironetina, después de 4 horas y a una concentración de 50 nM, provocó una despolimerización completa de los microtúbulos (Figura 53 C): dichos polímeros se vieron totalmente desorganizados y muy diferentes de la preparación de las células sin tratar (Figura 53 A), en la cual los microtúbulos estaban muy bien organizados. En comparación, los análogos **22** (G, H), **24** (K, L), **25** (I, J), **29** (E, F) y **23** (Figura 54 E, F) siguieron siendo activos, aunque a una concentración de 200  $\mu$ M ( $4 \times 10^3$  veces superior que pironetina). En las preparaciones se observaron células mitóticas metafásicas con un huso mitótico de tipo III (Jordan et al., 1992) (Figura 53 inserto en E y I) y un ADN a forma de anillo (Figura 53 inserto en F y J) que, como en el caso de la pironetina (Figura 53 inserto D), rodea el monoáster de microtúbulos.



**Figura 53.** Efectos de los análogos de pironetina **22**, **24**, **25** y **29** en comparación con la molécula parental (pironetina) sobre la red de microtúbulos y la morfología del núcleo. Las células A549 se incubaron durante 4 horas en presencia de DMSO (A, B), pironetina 50 nM (C, D), **29** 200  $\mu$ M (E, F), **22** 200  $\mu$ M (G, H), **25** 200  $\mu$ M (I, J), y **24** 200  $\mu$ M (K, L). Los microtúbulos (A, C, E, G, I, K) se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina, mientras que el ADN (B, D, F, H, J, L) se marcó con Hoechst 33342. Las inserciones (A, B, C, D, E, F, I, J) representan los husos mitóticos de las mismas preparaciones. La barra (L) representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento.

Tras 24 horas de incubación y en presencia de los compuestos **26**, **27**, **28**, **30**, **31**, **32** y **33** a una concentración de 200  $\mu$ M se observó, como en el caso anterior, una total despolimerización de la red microtubular. Además, en todas las preparaciones se evidenciaron muchas mitosis aberrantes (Figura 54).



**Figura 54.** Efectos de los análogos de pironetina **23**, **26**, **27**, **28**, **30**, **31**, **32** y **33** en comparación con la molécula parental (pironetina) sobre la red de microtúbulos y la morfología del núcleo. Las células A549 se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSO (A, B), pironetina 50 nM (C, D), **26** 200  $\mu$ M (G, H), **27** 200  $\mu$ M (I, J), **28** 200  $\mu$ M (K, L), **30** 200  $\mu$ M (M, N), **31** 200  $\mu$ M (O, P), **32** 200  $\mu$ M (Q, R) y **33** 200  $\mu$ M (S, T) y durante 4 horas en presencia de **23** 200  $\mu$ M (E, F). Los microtúbulos (A, C, E, G, I, K, M, O, Q, S) se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina, mientras que el ADN (B, D, F, H, J, L, N, P, R, T) se marcó con Hoechst 33342. Las inserciones (A, B, C, D, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R) representan los husos mitóticos de las mismas preparaciones. La barra (T) representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento.

### 3.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.

Posteriormente, con el fin de comprobar si los análogos de pironetina bloqueaban las células en la fase G<sub>2</sub>/M (propiedad común de los agentes antimitóticos), se llevaron a cabo experimentos destinados al estudio del efecto de dichos ligandos sobre el ciclo celular.

Para ello, se incubaron células humanas de carcinoma de pulmón A549 durante 20 horas en presencia de la pironetina y sus análogos, se analizaron

los cambios durante el ciclo celular, determinando el contenido de ADN por citometría de flujo, y se calculó el porcentaje de células en cada fase (Figura 55 y Tabla 27).

El ensayo reveló que la pironetina (**21**) bloqueó la mayoría de las células en la fase G<sub>2</sub>/M a una concentración de 50 nM. De la misma manera, los análogos ensayados (**22-33**) incrementaron el número de células en dicha fase del ciclo. El efecto se vio mucho más pronunciado para los análogos **26-33** (cuyas estructuras presentaron el grupo hidroxilo en posición C7). Sin embargo, a mayores concentraciones se observó un gran efecto citotóxico.

**Figura 55.** Efecto sobre el ciclo celular en células humanas de carcinoma de pulmón A549, incubadas durante 20 horas en presencia de pironetina y de los análogos **22-33**. Control: células sin tratar. Se muestra la concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.

Compuesto		% G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% S	% G <sub>2</sub> /M
Control		72.2	5.7	22.1
Pironetina	50 nM	4.2	3.8	92.0
22	50 µM	38.8	13.2	48.0
23	50 µM	39.8	9.7	50.5
24	50 µM	52.3	12.7	35.0
25	50 µM	56.9	6.4	35.3
26	200 µM	33.4	5.7	60.9
27	100 µM	30.6	3.5	65.9
28	200 µM	39.9	16.6	43.5
29	200 µM	32.0	14.0	54.0
30	100 µM	27.8	1.1	71.1
31	100 µM	38.9	2.5	58.7
32	200 µM	30.2	15.9	53.9
33	100 µM	35.7	4.3	56.9

**Tabla 27.** Porcentajes de células A549 en cada fase del ciclo celular tras la incubación de 20 horas en presencia de la concentración más pequeña de ligandos que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M.

Como consecuencia de los resultados celulares, se concluyó que aunque los análogos de la familia de pironetina mostraron una actividad citotóxica menor que la misma molécula parental, dichos compuestos fueron igualmente capaces de perturbar la red microtubular. Los análogos **22**, **23**, **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31**, **32** y **33** detuvieron las células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular, pero en presencia de dichos ligandos no se observaron células apoptóticas, lo mismo que se observó en presencia de la pironetina. Por otro lado, los compuestos en examen indujeron mitosis aberrantes y despolimerizaron los microtúbulos. De la misma manera, los análogos **24** y **25** indujeron mitosis aberrantes y determinaron despolimerización de los microtúbulos, pero detuvieron las células en fase G<sub>2</sub>/M de forma menos potente.

### 3.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.

#### 3.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.

Con el fin de evaluar si el débil efecto observado hasta ahora a nivel del citoesqueleto, debido a los análogos **22–33**, tiene lugar como consecuencia de su unión a microtúbulos, de manera similar a lo que acontece con la pironetina, se llevó a cabo la determinación de la concentración crítica de la tubulina, a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , en presencia de un gran exceso de compuestos (100  $\mu\text{M}$ ) y en tampón GAB-1 mM GTP (en el cual la tubulina es capaz de ensamblar con una Cr de  $3.3 \pm 0.02 \mu\text{M}$  a 37 °C y en ausencia de ligando exógeno, como se ha comentado anteriormente) (Buey et al., 2005).

Bajo dichas condiciones de ensayo, los valores de Cr del docetaxel y de la pironetina fueron 0.40  $\mu\text{M}$  y  $> 15 \mu\text{M}$ , respectivamente. La actividad más elevada para los análogos se observó en presencia de los compuestos **22–25** (carentes del grupo hidroxilo en posición C7), mientras que los compuestos más débiles resultaron el **30** y el **33** (Tabla 28).

Compuesto	Cr ( $\mu\text{M}$ )
DMSO	$3.3 \pm 0.10$
Docetaxel	$0.4 \pm 0.12$
Pironetina	$> 15 \mu\text{M}$
<b>22</b>	$3.73 \pm 0.35$
<b>23</b>	$3.75 \pm 0.11$
<b>24</b>	$3.79 \pm 0.10$
<b>25</b>	$3.85 \pm 0.16$
<b>26</b>	$3.41 \pm 0.06$
<b>27</b>	$3.57 \pm 0.19$
<b>28</b>	$3.71 \pm 0.21$
<b>29</b>	$3.64 \pm 0.21$
<b>30</b>	$3.39 \pm 0.07$
<b>31</b>	$3.58 \pm 0.06$
<b>32</b>	$3.6 \pm 0.09$
<b>33</b>	$3.44 \pm 0.03$

**Tabla 28.** Modulación del ensamblaje de tubulina en presencia de los compuestos estudiados, en GAB-1 mM GTP. Se indican las concentraciones críticas (valor promedio y error estándar de una media de cinco experimentos independientes) del ensamblaje de tubulina (20  $\mu\text{M}$ ) en

presencia de pironetina (25  $\mu\text{M}$ ) y de sus análogos (100  $\mu\text{M}$ ). La muestra DMSO contiene la misma proporción de dimetilsulfóxido que el resto de muestras, la muestra docetaxel contiene docetaxel a la misma concentración que los compuestos probados.

Los resultados obtenidos confirmaron que la actividad observada en presencia de los análogos de pironetina en células podía atribuirse a la interacción de dichos análogos con la tubulina. Además, el efecto exhibido *in vitro* se correlacionó bien con los valores de citotoxicidad previamente determinados.

### **3.4. Determinación de la unión de los compuestos a microtúbulos.**

#### **3.4.1. Unión de los análogos de pironetina al sitio en $\alpha$ -tubulina.**

Una vez aclarada la diana biológica para los análogos de pironetina, se analizó su sitio de unión en la tubulina.

Cuando un ligando no muestra un cambio visible en una propiedad medible (por ejemplo absorbancia o fluorescencia) tras la unión a una proteína, la caracterización precisa de su interacción puede llegar a ser una tarea bastante compleja. En estos casos, es posible observar la existencia de dicha interacción por medio de la competición entre el ligando en examen y uno de referencia para el mismo sitio de unión. Cuando realmente tiene lugar esta “lucha”, la unión del ligando de referencia a su sitio se ve perturbada por la presencia del otro ligando, por lo que se podrá presumir que están compitiendo por el mismo sitio de unión (Díaz and Buey, 2007).

Por tanto, con el fin de analizar el sitio de unión de los análogos **22–33** en la tubulina, se realizó un ensayo de competición entre dichos compuestos y la pironetina (ligando de referencia, cuya unión, covalente, se determinó en  $\alpha$ -tubulina años atrás) (Usui et al., 2004a). Suponiendo que un porcentaje de los sitios de unión de la pironetina esté bloqueado por el ligando de referencia, una proporción de pironetina permanecerá sin reaccionar (es decir, no estaría unida covalentemente) y podría ser medida mediante la extracción con un solvente orgánico, tal y como se ha descrito en Materiales y métodos.

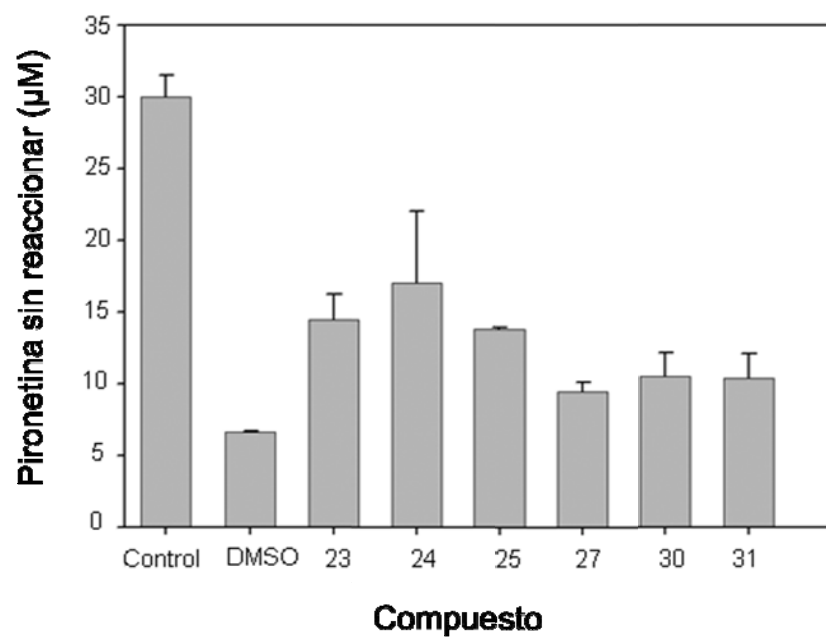
Para la realización del ensayo, se incubó la tubulina (25  $\mu\text{M}$ ) en el tampón GAB en presencia de los diferentes análogos (200  $\mu\text{M}$ ) o de DMSO (vehículo). Se añadió el ligando de referencia (30  $\mu\text{M}$ ) a las muestras y, después de la extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , se determinó la cantidad de pironetina no unida por HPLC.

La figura 56 muestra que en ausencia de tubulina (control) toda la pironetina (30  $\mu\text{M}$ ) permaneció sin reaccionar en la fase líquida. En presencia del vehículo (DMSO) 23.4  $\mu\text{M}$  de la molécula estuvo unida covalentemente a la tubulina, ya que sólo una concentración 6.6  $\mu\text{M}$  de compuesto se extrajo con el solvente orgánico. Cuando los microtúbulos se incubaron previamente con los análogos, un porcentaje significativo de los sitios de unión a pironetina se vio bloqueado. Los análogos que carecían del hidroxilo en posición C7 (**23**, **24** y **25**) exhibieron el efecto más significativo (lo mismo que se observó en la inhibición del ensamblaje de tubulina). En presencia de dichos compuestos prácticamente una concentración 10  $\mu\text{M}$  de los sitios de unión de pironetina estuvieron protegidos y aproximadamente 15  $\mu\text{M}$  de pironetina siguió sin reaccionar. En presencia de los ligandos **27**, **30** y **31** (que contenían el hidroxilo en C7) aproximadamente 4  $\mu\text{M}$  de los sitios de unión de pironetina estuvieron preservados y alrededor de 10  $\mu\text{M}$  de pironetina siguió sin reaccionar.

Como consecuencia, concentraciones de análogos **23**, **24**, **25**, **27**, **30** y **31** similares a aquellas requeridas para matar a las células tumorales resultaron en un aumento de la concentración crítica de tubulina purificada necesaria para el ensamblaje, lo que indicó que la tubulina representó, en realidad, su diana celular.

Las altas concentraciones de los análogos estudiados, necesarias para bloquear la unión de la pironetina a la  $\alpha$ -tubulina, indicaron que los productos de síntesis competían con la molécula de referencia y se unían al mismo sitio, aunque con una menor afinidad.





**Figura 56.** Protección del sitio de unión en  $\alpha$ -tubulina por los análogos **23**, **24**, **25**, **27**, **30** y **31** (200  $\mu$ M). La pironetina (30  $\mu$ M) y la mezcla de reacción se incubaron durante 15 minutos a 37 °C. Control: ausencia de tubulina. Se representan las concentraciones de pironetina extraídas con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Los datos ( $\pm$  errores estándar) indican la media de tres experimentos independientes.

## 4. Familia de podofilotoxina.

### 4.1. Caracterización químico-física de los compuestos.

#### 4.1.1. Caracterización química.

La podofilotoxina representa uno de los compuestos naturales más interesantes en quimioterapia del cáncer. A pesar de su potencial inicial como droga antitumoral (debida a la inhibición de la polimerización de tubulina, como consecuencia de su unión al sitio de la colchicina), los ensayos clínicos se abandonaron por la toxicidad y los severos efectos secundarios de dicho compuesto (Imbert, 1998).

Un extenso programa de optimización de la relación estructura-actividad de dicho ligando resultó en el desarrollo de nuevas moléculas diseñadas para superar sus limitaciones (Schacter, 1996; Stahelin and von Wartburg, 1989; Stahelin and von Wartburg, 1991). Muchas de estas drogas se encuentran bajo estudios clínicos (Kluza et al., 2006; Clinical Trials; Chang et al., 2003).

Datos recientes sobre la termodinámica de unión de la podofilotoxina a la tubulina (Gupta et al., 2006), así como el diseño y la evaluación de nuevos inhibidores de microtúbulos (Kim do et al., 2006) revelan el interés actual en este campo de investigación. Ulteriores trabajos sugieren que dichas moléculas son eficaces en células tumorales resistentes a quimioterapia (Gordaliza et al., 1994).

Por tanto, con el fin de mejorar la afinidad y la selectividad de interacción de dichos compuestos con la tubulina y reducir los efectos adversos de la podofilotoxina, nos planteamos comprobar la actividad en células de unos productos de síntesis de la familia de podofilotoxina, su unión a microtúbulos y establecer la relación estructura-función de dichos ligandos, de modo que podamos conocer los determinantes estructurales que resultan en mejor afinidad y efectos celulares. Asimismo deseamos llevar a cabo estudios de *docking* asistidos por ordenador de la interacción de los análogos de podofilotoxina con la tubulina y comprobar el sitio de unión en los microtúbulos.

Para la realización de dicho estudio, se recibieron el ligando podofilotoxina (**34a**) más una amplia serie de análogos (**35 $\beta$** , **36 $\beta$** , **37 $\beta$** , **38 $\beta$** ,

**39 $\alpha$** , **39 $\beta$** , **40 $\alpha$** , **40 $\beta$** , **41**), caracterizado cada uno por una cadena distinta en posición C7.

La figura 57 muestra las estructuras de los ligandos objeto de estudio.

Los códigos  $\alpha$  y  $\beta$  se refieren a la configuración del grupo hidroxilo situado en posición C7, que puede ser orientado como en podofilotoxina (**34a**: 7 $\alpha$ -OH) o como en epipodofilotoxina (**34b**: 7 $\beta$ -OH). Todos los derivados se sintetizaron a partir del compuesto podofilotoxona (**34c**).

**Figura 57.** Estructuras químicas de podofilotoxina (**34a**) y sus derivados. Los compuestos **34b** y **34c** no se emplearon en el presente trabajo.

#### 4.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Con el fin de detectar los compuestos en examen para el estudio de la interacción de dichos ligandos con la tubulina, se realizaron ensayos de cromatografía líquida de alta resolución.

La detección de los compuestos por HPLC se analizó en un cromatógrafo Agilent 1100, empleando una columna Synergy Max-RP C12, gradiente de H<sub>2</sub>O + 0.1 % TFA/CH<sub>3</sub>CN + 0.1 % TFA del 45 % al 85 % durante 5 minutos y 0.6 ml/min de flujo a una  $\lambda = 254$  nm. La pureza de todos los ligandos resultó ser  $\geq 95$  %.

#### 4.2. Efectos de los ligandos en células.

##### 4.2.1. Citotoxicidad.

Con el fin de estudiar la actividad biológica de los compuestos en examen se analizaron, en primer lugar, los resultados de IC<sub>50</sub> realizados por la compañía biofarmacéutica española Pharmamar, tal y como se detalla en Abad et al., 2012.

En la tabla 29 se resumen los valores obtenidos en células humanas de carcinoma de pulmón A549 en presencia de los ligandos de la familia de podofilotoxina objeto de estudio.

Como se puede observar, los compuestos mostraron una actividad bastante citotóxica. La mayoría de dichos agentes presentó efecto a una concentración nM. Los ligandos más activos fueron el compuesto **39 $\beta$**  (CI<sub>50</sub> 6.4 nM) y **40 $\beta$**  (CI<sub>50</sub> 29 nM). Los menos activos resultaron ser el compuesto **39 $\alpha$**  (CI<sub>50</sub> 5.68  $\mu$ M) y el **40 $\alpha$**  (CI<sub>50</sub> 8.92  $\mu$ M). Se observó que la introducción de un sustituyente muy grande en posición C7 no provocó una pérdida considerable de la actividad de los compuestos. Los derivados de la serie 7 $\beta$ -OH exhibieron una citotoxicidad mucho mayor que la de sus correspondientes análogos de la serie 7 $\alpha$ -OH. Este hecho se observa en las parejas de epímeros **40 $\beta$ /40 $\alpha$**  y **39 $\beta$ /39 $\alpha$** , por los cuales el ratio de potencia alcanza hasta más de 2 y 3 órdenes de magnitud, respectivamente.

Compuesto	A549 (nM)
<b>34a*</b>	12
<b>34b*</b>	60
<b>35<math>\beta</math></b>	139 $\pm$ 5
<b>36<math>\beta</math></b>	191 $\pm$ 18
<b>37<math>\beta</math></b>	444 $\pm$ 12
<b>38<math>\beta</math></b>	90.8 $\pm$ 1.3
<b>39<math>\alpha</math></b>	5680 $\pm$ 6
<b>39<math>\beta</math></b>	6.4 $\pm$ 0.15
<b>40<math>\alpha</math></b>	8920 $\pm$ 317
<b>40<math>\beta</math></b>	29 $\pm$ 1.1
<b>41</b>	79.5 $\pm$ 9.0

**Tabla 29.** Citotoxicidad de los ligandos de la familia de podofilotoxina en células de carcinoma de pulmón A549. Los datos representan la media ( $\pm$  errores estándar) de al menos tres experimentos diferentes. \*Datos previos (Gordaliza et al., 1994).

#### **4.2.2. Efecto sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear: ensayo de inmunofluorescencia indirecta.**

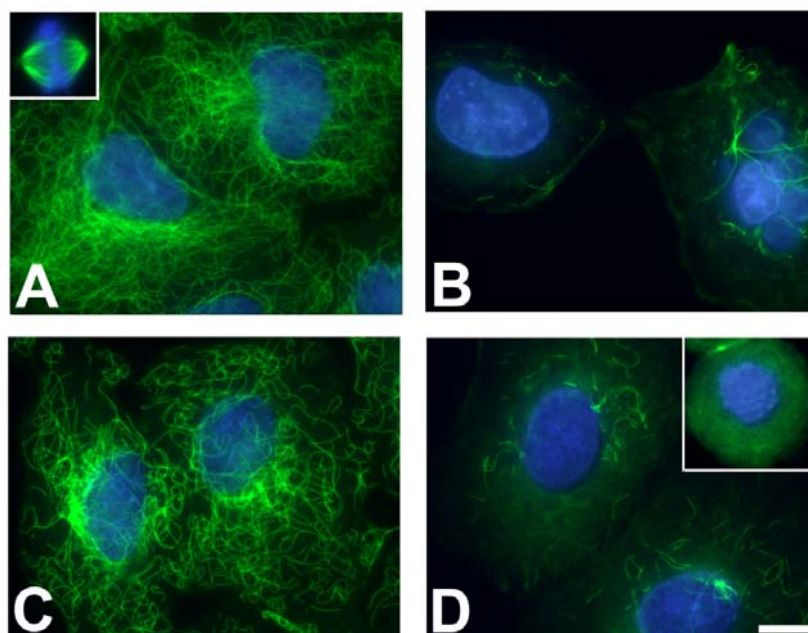
Con el fin de evaluar la actividad de los ligandos en examen a nivel del citoesqueleto, se decidió estudiar el efecto de dichas moléculas sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear, en comparación con la podofilotoxina.

Para ello, se emplearon células humanas de carcinoma de pulmón A549 incubadas durante 24 horas en presencia del compuesto **34a** y de los derivados **35 $\beta$** , **36 $\beta$** , **37 $\beta$** , **38 $\beta$** , **39 $\alpha$** , **39 $\beta$** , **40 $\alpha$** , **40 $\beta$**  y **41** (Figuras 56, 57, 58).

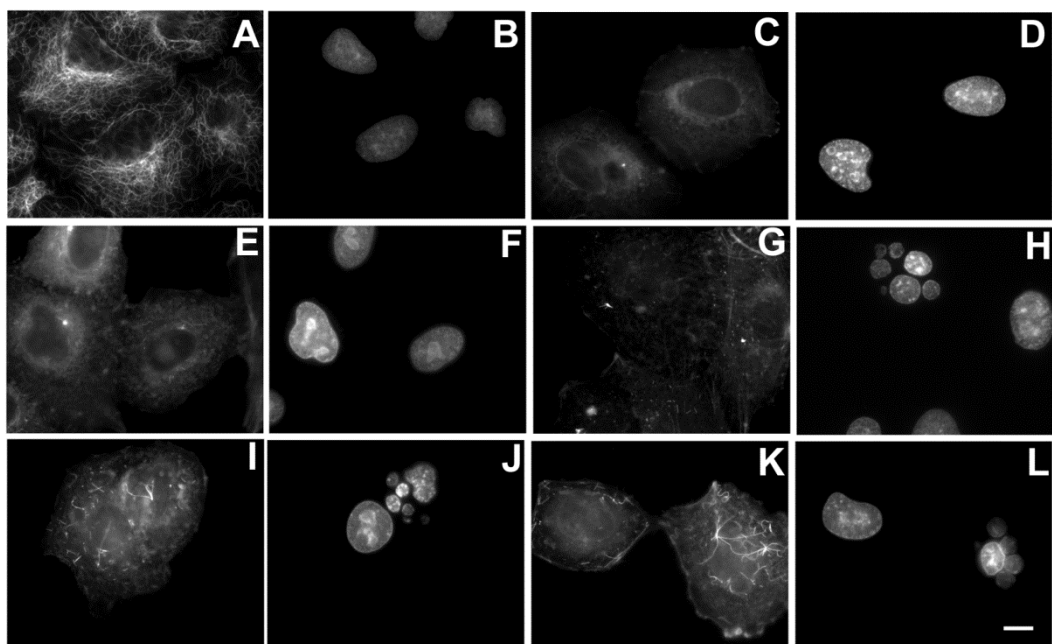
El tratamiento con los compuestos objeto de estudio determinó una completa despolimerización de los microtúbulos en las células. Se observaron algunas células micronucleadas y algunas paradas en la prometafase del ciclo, caracterizadas por el ADN condensado formando una bola y sin ninguna evidencia de microtúbulos del huso mitótico (huso de tipo IV) (Jordan et al., 1992).

En la figura 58 se muestran los efectos de los epímeros **40 $\beta$**  y **40 $\alpha$**  sobre dicha red microtubular. Ambos compuestos ensayados fueron capaces de alcanzar el mismo nivel de despolimerización en las células pero con una gran diferencia de actividad a favor del compuesto **40 $\beta$** , cuya potencia de acción resultó 200 veces más alta. Resultados similares se obtuvieron en presencia de los epímeros **39 $\beta$**  y **39 $\alpha$**  (Figura 60).

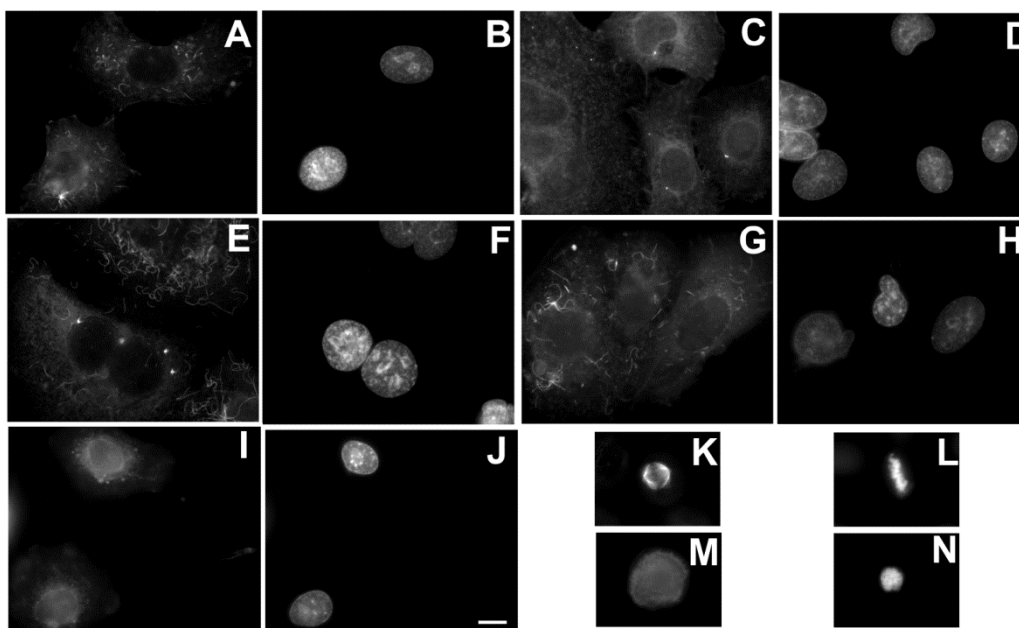
La podofilotoxina y el resto de los ligandos estudiados manifestaron un comportamiento muy parecido al previamente descrito.



**Figura 58.** Efectos de los análogos de **34a**, **40 $\beta$**  y **40 $\alpha$** , sobre la red de microtúbulos. Las células A549 se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSO (A), **40 $\beta$**  0.5  $\mu$ M (B), **40 $\alpha$**  50  $\mu$ M (C), **40 $\alpha$**  100  $\mu$ M (D). Los microtúbulos se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina, mientras que el ADN se marcó con Hoechst 33342. Las inserciones (A, B, C, D) representan los husos mitóticos de las mismas preparaciones. La barra (D) representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento.



**Figura 59.** Efectos del compuesto **34a** y sus derivados sobre la red de microtúbulos de células A549 incubadas durante 24 horas en presencia de DMSO (A, B), **34a** 2.5  $\mu\text{M}$  (C, D), **38 $\beta$**  2  $\mu\text{M}$  (E, F), **41** 0.05  $\mu\text{M}$  (G, H), **37 $\beta$**  5  $\mu\text{M}$  (I, J), **40 $\beta$**  0.5  $\mu\text{M}$  (K, L). Los microtúbulos se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina (A, C, E, G, I, K), mientras que el ADN (B, D, F, H, J, L) se marcó con Hoechst 33342. La barra (L) representa 10  $\mu\text{m}$ . Todos los paneles tienen el mismo aumento.



**Figura 60.** Efectos del compuesto **34a** y sus derivados sobre la red de microtúbulos de células A549. **39α** 100  $\mu$ M (A, B), **35β** 2  $\mu$ M (C, D), **36β** 5  $\mu$ M (E, F), **39β** 0.05  $\mu$ M (G, H), **39α** 20  $\mu$ M (I, J), huso mitótico control (K, L), **38β** 2  $\mu$ M (M, N) células en arresto mitótico. Los microtúbulos se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina (A, C, E, G, I), mientras que el ADN (B, D, F, H, J) se marcó con Hoechst 33342. La barra (J) representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento.

Los resultados obtenidos se correlacionaron bien con aquéllos obtenidos en los ensayo de ensamblaje de tubulina (ver más adelante, figura 62).

#### 4.2.3. Efecto sobre el ciclo celular.

Con el propósito de corroborar la capacidad desestabilizante de microtúbulos de los compuestos, revelada por los ensayos de inmunofluorescencia, se realizaron estudios sobre el ciclo celular.

Dichos experimentos se realizaron incubando previamente las células humanas de carcinoma de pulmón A549 durante 20 horas en presencia de los distintos compuestos de la familia de podofilotoxina (empleando un rango de concentraciones entre 0.01  $\mu$ M y 100  $\mu$ M), analizando posteriormente los cambios durante el ciclo celular por citometría de flujo y, finalmente, calculando el porcentaje de células en cada fase del ciclo.



De manera grafica se muestran los resultados de dicho ensayo en la figura 61 y tabla 30.

El ensayo empleado reveló que todos los compuestos, aunque con menor eficacia que la podofilotoxina, detuvieron las células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular, como indica el elevado número de células con contenido tetraploide de ADN (70-80 %).

Los compuestos con una configuración 7 $\beta$ -hidroxi/7 $\alpha$ -(1-hidroxialquil) fueron bastante más eficaces que sus correspondiente epímeros, y los compuestos más activos, **41** y **39 $\beta$** , indujeron un bloqueo de las células en la fase G<sub>2</sub>/M a concentraciones de un orden de magnitud más bajo que el del producto de referencia (**34a**). Por otro lado, el ligando **40 $\alpha$**  mostró su efecto a una concentración de 100  $\mu$ M (dos órdenes de magnitud más altos que el compuesto parental), como era previsible por los resultados obtenidos anteriormente.

**Figura 61.** Efecto sobre el ciclo celular en células A549, incubadas durante 20 horas en presencia de podofilotoxina y sus derivados. Se muestra el contenido de ADN de las células,

determinado por citometría de flujo. Se muestra la concentración más pequeña de ligando que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M del ciclo celular.

Compuesto		% G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	% S	% G <sub>2</sub> /M
Control		61	24.9	14.1
<b>34a</b>	<b>1 µM</b>	10.2	5.9	83.9
<b>35β</b>	<b>1 µM</b>	31.3	24.5	44.2
<b>35β</b>	<b>10 µM</b>	8	25.9	66.1
<b>36β</b>	<b>1 µM</b>	71.1	2.8	26.1
<b>36β</b>	<b>10 µM</b>	9.9	13.2	76.9
<b>37β</b>	<b>1 µM</b>	75.8	4.9	19.3
<b>37β</b>	<b>10 µM</b>	10.6	8.6	80.8
<b>38β</b>	<b>1 µM</b>	52.4	10.4	37.2
<b>38β</b>	<b>10 µM</b>	14.6	0.3	85.1
<b>39α</b>	<b>1 µM</b>	61	22	17
<b>39α</b>	<b>10 µM</b>	31.4	27.4	41.2
<b>39β</b>	<b>0.01 µM</b>	76.1	1.1	22.8
<b>39β</b>	<b>0.1 µM</b>	10.6	18.6	70.8
<b>40α</b>	<b>10 µM</b>	64.2	25.5	10.3
<b>40α</b>	<b>100 µM</b>	14.3	13.3	72.4
<b>40β</b>	<b>0.1 µM</b>	60.5	18.1	21.4
<b>40β</b>	<b>1 µM</b>	12.6	6.0	81.4
<b>41</b>	<b>0.01 µM</b>	60.9	23.2	15.9
<b>41</b>	<b>0.1 µM</b>	10.3	18.0	71.7

**Tabla 30.** Porcentajes de células A549 en cada fase del ciclo celular tras la incubación de 20 horas en presencia de la concentración más pequeña de podofilotoxina (**34a**) y de los derivados de la misma familia que generó la máxima acumulación de células en la fase G<sub>2</sub>/M.

### 4.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.

#### 4.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.

El hecho de que un compuesto sea capaz de desestabilizar los microtúbulos implica que debe de alguna forma estar modulando el ensamblaje de tubulina.

Con el fin de confirmar dicha capacidad desestabilizante de los agentes en cuestión, se evaluó el grado de polimerización de tubulina mediante la formación de un sedimento (ensayo de centrifugación) en presencia de concentraciones estequiométricas y subestequiométricas de los compuestos estudiados.

La figura 62 muestra las curvas de inhibición del ensamblaje de tubulina.

Los resultados obtenidos confirmaron la potencia en la inhibición del ensamblaje de tubulina en presencia de la mayoría de los compuestos ensayados, observando, para muchos de ellos, efectos más potentes que en presencia del ligando **34a**. Los ligandos más activos fueron los análogos **39 $\beta$**  y **41**. El menos potente fue el compuesto **40 $\alpha$** .

Fue interesante observar, en paralelo con los valores de citotoxicidad (véase tabla 29), que los compuestos de la serie 7 $\alpha$ -OH exhibieron un efecto más bajo que los de la serie 7 $\beta$ -OH (**39 $\alpha$** , **40 $\alpha$**  vs **39 $\beta$** , **40 $\beta$** , respectivamente).

**Figura 62.** Inhibición del ensamblaje de tubulina en presencia de los derivados de la familia de podofilotoxina (**34a**). **A:** **34a**, **35 $\beta$** , **36 $\beta$** , **37 $\beta$** , **38 $\beta$** , y **41**. **B:** **34a**, **39 $\alpha$** , **39 $\beta$** , **40 $\alpha$** , y **40 $\beta$** .

#### **4.4. Determinación del sitio de unión de los ligandos en microtúbulos.**

##### **4.4.1. Unión de los compuestos al sitio de colchicina.**

Con el fin de complementar los estudios anteriores y confirmar el mecanismo postulado para los derivados de la familia de podofilotoxina, se realizó entonces un ensayo de competición que permitiese determinar el sitio de unión de dichos compuestos.

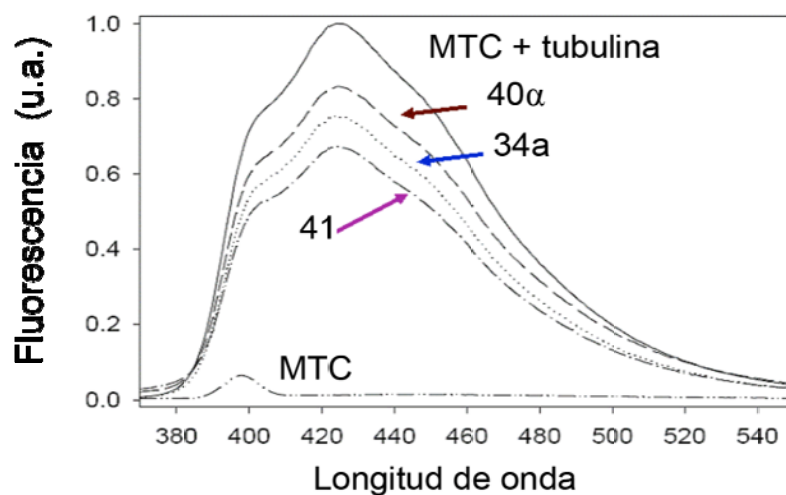
Para ello, se realizaron estudios de desplazamiento del compuesto 2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-ona (MTC) (ligando de

unión reversible a tubulina en el sitio de la colchicina) (Fitzgerald, 1976; Medrano et al., 1991).

Gráficamente, se muestran los resultados obtenidos en presencia de la podofilotoxina (**34a**), del derivado más potente (**41**) y del menos potente (**40 $\alpha$** ) (seleccionados como ejemplos representativos) (Figura 63).

Como puede apreciarse en dicha figura, el compuesto **34a** determinó un desplazamiento intermedio del MTC en comparación con los otros dos ligandos mostrados.

En su estado libre el MTC (10  $\mu$ M) bajo excitación a 350 nm no mostró ningún nivel de fluorescencia apreciable (línea inferior) el cual, sin embargo, se observó una vez añadida la tubulina (10  $\mu$ M) (línea continua superior). En presencia de los compuestos **41**, **34a** y **40 $\alpha$**  (20  $\mu$ M) dicha fluorescencia disminuyó el 35, 25 y 15 %, respectivamente. La pequeña disminución de fluorescencia producida por el compuesto **40 $\alpha$**  pudo ser inespecífica. No pueden además descartarse potenciales efectos quenching o de tipo alostéricos.



**Figura 63.** Desplazamiento de MTC del sitio de colchicina por los derivados de la familia de podofilotoxina: espectros de emisión del compuesto MTC (10  $\mu$ M) y de la tubulina (10  $\mu$ M), en 10 mM fosfato sódico 0.1 mM GTP, pH 7.0, en presencia de los ligandos **40 $\alpha$** , **34a** y **41** (20  $\mu$ M). La línea inferior representa el espectro de emisión de fluorescencia de 10  $\mu$ M de MTC en el mismo tampón.

Como se había predicho, estos resultados se correlacionaron bien con aquéllos observados en los ensayos anteriores de inhibición de ensamblaje de tubulina.

#### **4.5. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a tubulina.**

##### **4.5.1. Modelado molecular.**

Con el fin de profundizar a nivel atómico el estudio de la interacción de los ligandos unidos a tubulina, se realizaron experimentos de modelado molecular en el laboratorio del Dr. San Feliciano, de la Universidad de Salamanca.

Los resultados obtenidos se mostrarán más adelante en el apartado Discusión.

## **Caracterización de compuestos que interactúan con actina y microfilamentos.**

### **5. Familia de amfidinolidas.**

#### **5.1. Caracterización físico-química de los compuestos.**

##### **5.1.1. Caracterización química.**

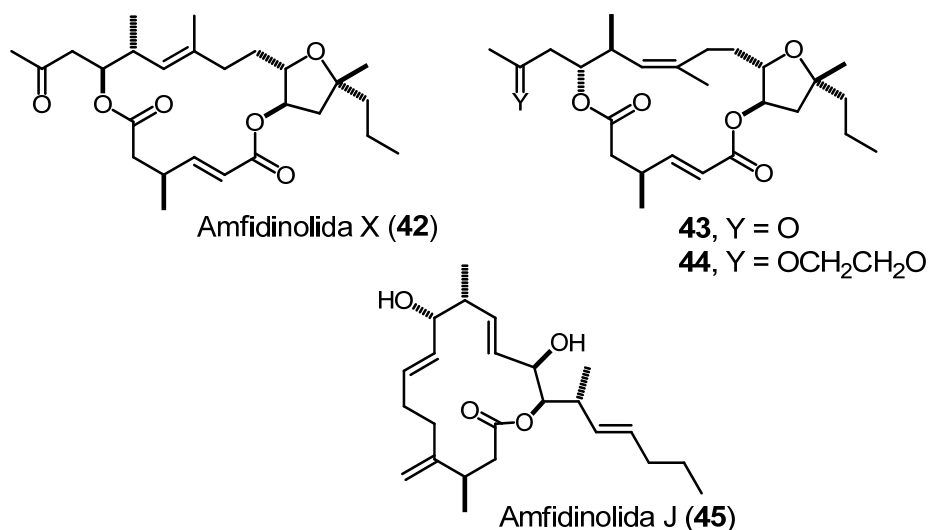
Las amfidinolidas son una serie de macrólidos estructuralmente distintos. Trabajos previos muestran que la amfidinolida H presenta citotoxicidad en muchas líneas tumorales a concentraciones nM y despolimeriza los filamentos de actina (Usui et al., 2004b), estabilizando dichos polímeros (Oda et al., 2005; Saito et al., 2004).

Por otro lado, ulteriores estudios sugieren que la mayoría de las amfidinolidas con estructuras más sencillas (amfidinolidas X y J) muestran efectos citotóxicos a una concentración  $\mu\text{M}$  (Tsuda et al., 2003; Kobayashi et al., 1993; Kobayashi and Kubota, 2007), aunque su(s) mecanismo(s) de acción no se conoce(n) hasta el momento.

Dado que los compuestos estructuralmente pequeños son más fáciles de sintetizar (Rodríguez-Escrich et al., 2008; Barbazanges et al., 2008; Nogales et al., 1998), nos propusimos elucidar el mecanismo de acción de dichas moléculas. Asimismo deseamos comprobar el efecto celular, así como su diana biológica. Por último deseamos llevar a cabo estudios de *docking* asistidos por ordenador, con el fin de establecer las bases estructurales de la unión a su diana.

Para la realización del presente trabajo, contamos con la amfidinolida X (**42**), dos diólidos sintéticos estructuralmente relacionados (**43** y **44**), y la amfidinolida J (**45**).

La figura 64 muestra las estructuras de este grupo de compuestos.



**Figura 64.** Estructuras químicas de amfidinolida X (42), de los dos diólidos estructuralmente relacionados (43 y 44) y de amfidinolida J (45).

### 5.1.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Con el fin de detectar los compuestos en examen para el estudio de la interacción de dichos ligandos con la tubulina, se realizaron ensayos de cromatografía líquida de alta resolución.

La detección de los compuestos por HPLC se analizó en un cromatógrafo Agilent 1100, empleando una columna de fase reversa C18, en un sistema isocrático de acetonitrilo en agua 75/25 (v/v) y 1 ml/min de flujo durante 30 minutos.

## 5.2. Efectos de los ligandos en células.

### 5.2.1. Citotoxicidad.

Con el fin de comprobar la actividad citotóxica de los ligandos objeto de estudio, se procedió a determinar su CI<sub>50</sub> en células humanas de carcinoma de ovario A2780 y de carcinoma de colon Lovo, empleando un ensayo de MTT, tal y como se ha descrito en Materiales y métodos.

En la tabla 31 se muestran los valores obtenidos para cada ligando.

En las condiciones experimentales empleadas, las moléculas estudiadas resultaron citotóxicas, aunque los valores indicaron una inhibición 10-30 veces más baja si comparados con aquéllos obtenidos años atrás en las células de



leucemia linfocítica de ratón L1210 en presencia de los compuestos **42** y **44**, cuyas CI50 fueron 1.3 y 6.9  $\mu\text{M}$ , respetivamente (Tsuda et al., 2003; Kobayashi et al., 1993; Kobayashi and Kubota, 2007). Los mejores resultados se obtuvieron en las células A2780 y el ligando **44** resultó ser el más potente en ambas líneas celulares empleadas.

Compuesto	A2780 ( $\mu\text{M}$ )	Lovo ( $\mu\text{M}$ )
<b>42</b>	60.7 $\pm$ 0.9	77.5 $\pm$ 0.3
<b>43</b>	39 $\pm$ 1.7	160 $\pm$ 25.8
<b>44</b>	37.6 $\pm$ 0.9	49 $\pm$ 0.3
<b>45</b>	43.7 $\pm$ 0.2	53.3 $\pm$ 0.2

**Tabla 31.** Citotoxicidad de las amfidinolidas objeto de estudio (**42-45**) en células humanas de carcinoma de ovario (A2780) y de colon (Lovo) incubadas durante 48 horas en presencia de estos ligandos. Los datos representan la media ( $\pm$  errores estándar) de tres experimentos independientes.

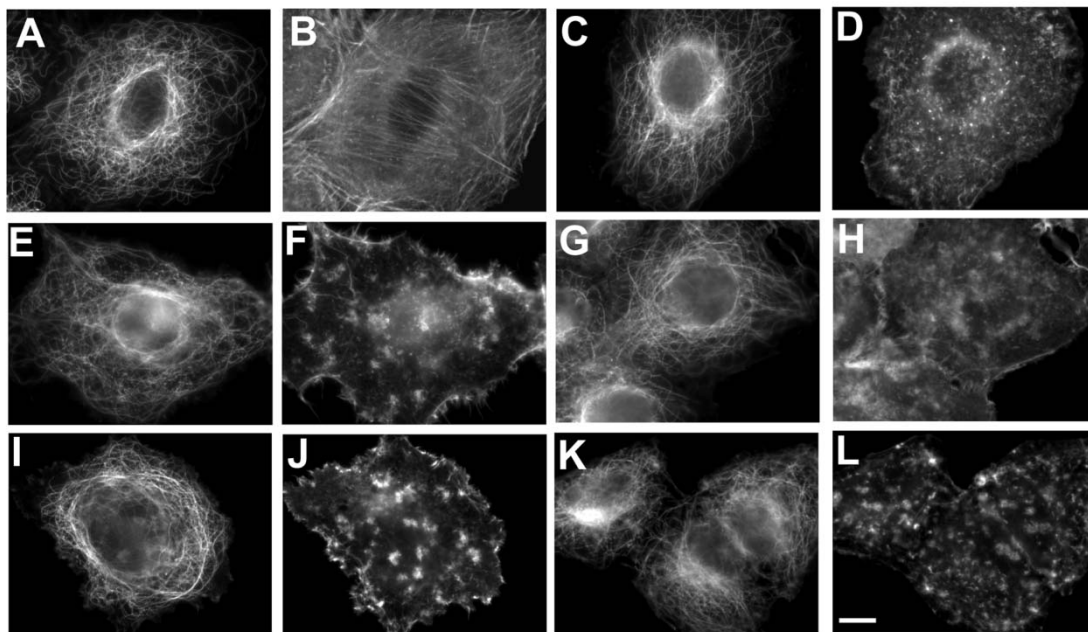
### 5.2.2. Efecto sobre los componentes del citoesqueleto (microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios) y la morfología celular.

Con el fin de comprobar la actividad de los compuestos objeto de estudio a nivel del citoesqueleto, se estudió el efecto de los ligandos **42-45** sobre la morfología celular y los distintos componentes del citoesqueleto: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios, mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

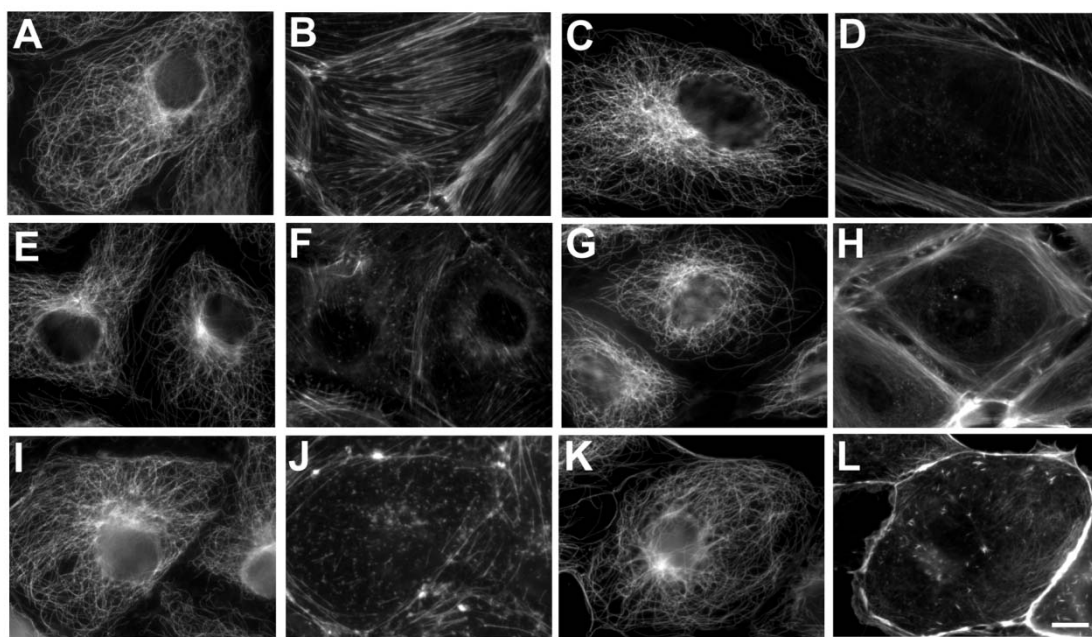
Para ello, se incubaron las células de carcinoma de pulmón A549 y células de riñón de rata canguro Ptk2 durante 4 y 24 horas, respectivamente, en presencia de elevadas concentraciones de ligandos **42-45** y utilizando como control la citocalasina B (un potente inhibidor de la formación de microfilamentos).

Las inmunofluorescencias (Figuras 65 y 66), en las líneas celulares ensayadas, no mostraron ningún efecto ni a nivel microtubular, ni en los filamentos intermedios (datos no mostrados). Por otro lado, comparadas con las células control (DMSO), se observaron cambios en la forma y dimensión de

los filamentos de actina, que conllevaron una completa despolimerización de dichos polímeros en ambas líneas ensayadas.



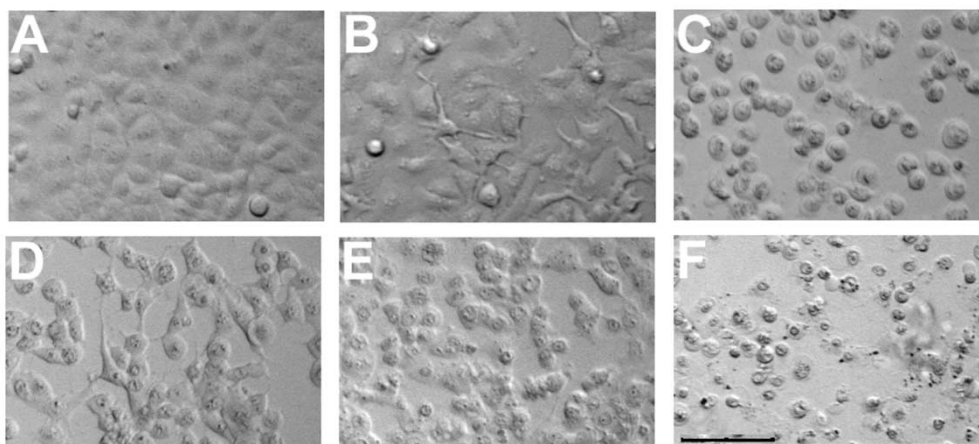
**Figura 65.** Efectos de los compuestos **42**, **43**, **44** y **45** sobre los microtúbulos (A, C, E, G, I, K) y los microfilamentos (B, D, F, H, J, L). Las células A549 se incubaron durante 4 horas en presencia de DMSO (A, B), **42** 250  $\mu$ M (C, D), **44** 250  $\mu$ M (E, F), **43** 250  $\mu$ M (G, H), **45** 250  $\mu$ M (I, J), y citocalasina B 2  $\mu$ M (K, L). Los microtúbulos se marcaron con el anticuerpo DM1A contra  $\alpha$ -tubulina, los microfilamentos se marcaron con Faloidina Texas-Red y el ADN con Hoechst 33342. La barra (L) representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles tienen el mismo aumento.



**Figura 66.** Efectos de los compuestos **42-45** sobre los microtúbulos (A, C, E, G, I, K) y los microfilamentos (B, D, F, H, J, L). Las células Ptk2 se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSO (A, B), **42** 600  $\mu\text{M}$  (C, D), **43** 600  $\mu\text{M}$  (E, F), **44** 600  $\mu\text{M}$  (G, H), **45** 300  $\mu\text{M}$  (I, J), y citocalasina B 2  $\mu\text{M}$  (K, L). La barra (L) representa 10  $\mu\text{m}$ . Todos los paneles tienen el mismo aumento.

Como complemento a los resultados que se acaban de describir, en la figura 67 se muestran los efectos de distintas concentraciones de los compuestos **42**, **44** y **45** sobre la morfología de las células tumorales A549 incubadas durante 24 horas.

Los resultados evidenciaron que, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , las amfidinolidas ensayadas alteraron (Figura 67, B, D y E) la morfología típica de las células A549 (Figura 67, A: células sin tratar), observándose además una disminución en el número de células. A concentraciones más altas (300  $\mu\text{M}$ ), los ligandos **42** y **45** (Figura 67, C y F) redondearon totalmente las células, lo mismo que ocurrió con el compuesto **44** a la misma concentración (datos no mostrados).



**Figura 67.** Morfología de las células A549 tratadas con los ligandos **42**, **44** y **45**. Las células se incubaron durante 24 horas en presencia de DMSO (A), **42** 100  $\mu$ M (B), **42** 300  $\mu$ M (C), **44** 300  $\mu$ M (D), **45** 100  $\mu$ M (E) y **45** 300  $\mu$ M (F). La barra (F) representa 10  $\mu$ m.

### 5.3. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de tubulina.

#### 5.3.1. Modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando.

Con el fin de examinar si las amfidinolidas en examen se unían a la tubulina, se estudió su potencial efecto en el ensamblaje de dicha proteína *in vitro*.

Para ello, se llevaron a cabo experimentos de determinación de la concentración crítica (Cr) de la tubulina en presencia de un 10 % de exceso de concentración de los compuestos, en tampón GAB-1 mM GTP pH 6.5.

Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37 °C y se centrifugaron tal y como se ha detallado en Materiales y métodos. Posteriormente, se tomaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados. La intensidad de fluorescencia intrínseca de la tubulina para cada fracción se midió en un espectrofluorímetro RF-540 de Shimadzu, convirtiendo dichos valores de fluorescencia en valores de concentración por medio de una curva patrón hecha con la misma tubulina.

El resultado del ensayo empleado puso de manifiesto que ninguno de los agentes de la familia de amfidinolidas alteraba la concentración de ensamblaje de tubulina, indicando por tanto que la actividad citotóxica no era consecuencia ni de la interacción de los diferentes ligandos con el heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina ni con los microtúbulos (datos no mostrados).

## 5.4. Determinación del sitio de unión de los ligandos en microtúbulos.

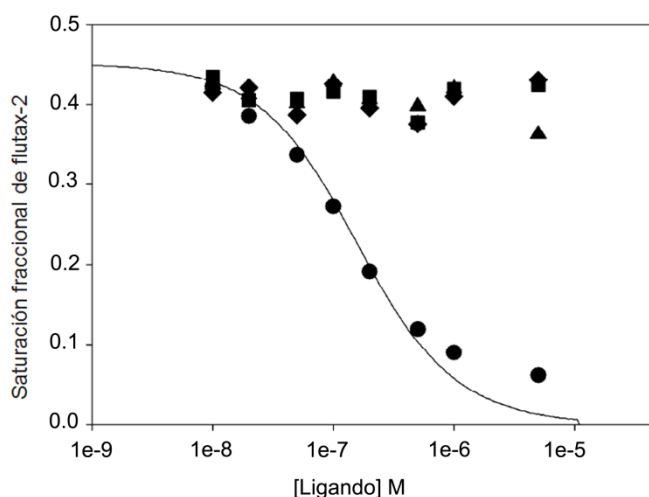
### 5.4.1. Unión al sitio de paclitaxel y de colchicina.

Con el fin de abordar la búsqueda del sitio de unión de los compuestos de la familia de amfidinolidas en el citoesqueleto, en primer lugar se estudió su interacción directa con los microtúbulos y con la tubulina no ensamblada, ensayándose con qué ligandos de los diferentes sitios de unión a tubulina conocidos podían competir.

Para ello, inicialmente se probó la unión de los compuestos **42**, **43** y **44** al sitio del paclitaxel (Nogales et al., 1995) en microtúbulos estabilizados.

Para ello, se realizaron experimentos de desplazamiento del análogo fluorescente, hidrosoluble y activo del paclitaxel, flutax-2, de su sitio de unión en microtúbulos estabilizados, determinando los valores de anisotropía de fluorescencia de la sonda tal y como se ha descrito en Materiales y métodos.

El ensayo empleado reveló que ninguna de las moléculas testadas fue capaz de desplazar el compuesto fluorescente del sitio del paclitaxel en los microtúbulos estabilizados. Sin embargo, las concentraciones ensayadas de docetaxel, usado como control, lograron alcanzar un 90 % de desplazamiento del flutax-2 de su sitio (Figura 68).



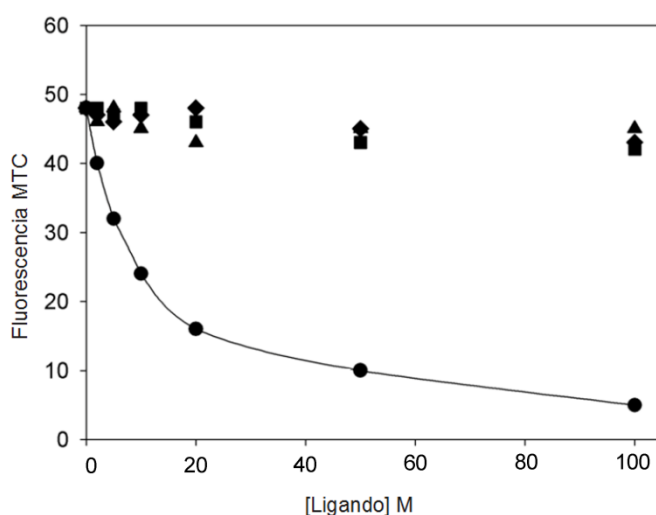
**Figura 68.** Desplazamiento del compuesto fluorescente flutax-2 del sitio del paclitaxel en los microtúbulos por las amfidinolidas, a 35 °C. Las líneas se generaron con el mejor valor de ajuste de la constante de equilibrio de unión de los competidores. Círculos y línea continua: docetaxel; cuadrados: ligando **42**; triángulos: compuesto **43**; rombos: ligando **44**.

De la misma forma se estudió la posibilidad de que los ligandos objeto de estudio se estuvieran uniendo al sitio de la colchicina, en la región intradimérica entre  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina (Ravelli et al., 2004).

Por ello, se llevaron a cabo ensayos de desplazamientos de MTC (análogo de la colchicina previamente descrito) que se comporta como fluoróforo tan sólo cuando está unido en su sitio en la tubulina. De este modo y como en el caso del desplazamiento de flutax-2, una disminución en los valores de emisión de fluorescencia del análogo de colchicina en presencia de concentraciones crecientes del compuesto analizado, revelará que el MTC está siendo desplazado de su sitio (Andreu et al., 1984; La Regina et al., 2007).

Así, se midió la emisión de fluorescencia del MTC empleando una  $\lambda_{\text{exc}} = 350$  nm, en ausencia y presencia de la tubulina (10  $\mu\text{M}$ ) y a concentraciones crecientes de compuestos **42**, **43** y **44**.

El ensayo empleado puso de manifiesto que los ligandos de la familia de amfidinolidas no fueron capaces de desplazar el MTC de su sitio en la tubulina (Figura 69).



**Figura 69.** Desplazamiento del análogo de colchicina, MTC (10  $\mu\text{M}$ ), del sitio de la colchicina en la tubulina (10  $\mu\text{M}$ ). Círculos y línea continua: podofilotoxina; cuadrados: compuesto **42**; triángulos: ligando **43**; rombos: compuesto **44**.

#### **5.4.2. Unión a microtúbulos estabilizados y nativos.**

Con el objetivo de averiguar si las amfidinolidas estudiadas se unían a tubulina en algún sitio expuesto en los microtúbulos ensamblados, se incubaron estos compuestos en presencia de dichos polímeros estabilizados o bien en las condiciones requeridas para su formación (Díaz et al., 2000). A continuación se sedimentaron por centrifugación; y los precipitados de microtúbulos, así como los sobrenadantes, se extrajeron con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. De este modo los ligandos se separan, pasando a la fase orgánica debido a su baja polaridad, de la proteína, que permanece en la interfase. La fase orgánica se analizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), en un sistema isocrático de acetonitrilo en agua 75/25 (v/v), cuantificando la cantidad de ligando en cada fracción empleando docetaxel como estándar interno.

Los resultados pusieron de manifiesto que los compuestos se detectaron en la fracción libre de microtúbulos y, como consecuencia, que no se habían unido ni a los microtúbulos estabilizados ni a los polímeros nativos en las condiciones ensayadas (datos no mostrados).

#### **5.5. Efectos de los ligandos en el ensamblaje de actina.**

##### **5.5.1. Modulación del ensamblaje de actina por ligando.**

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos a nivel celular, se decidió evaluar el efecto de los compuestos **42-45** sobre la modulación de la ensamblaje/desensamblaje de la actina.

Para ello, se emplearon ensayos, *in vitro*, de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina (Cytoskeleton BK003) en presencia de los ligandos **42-45** tal y como se ha descrito en Materiales y métodos.

Los resultados obtenidos (Figura 70) mostraron que, a una concentración de 300 µM, los compuestos **42**, **43** y **44** inhibieron prácticamente el 20 % del ensamblaje de actina. La misma concentración de ligando **45** causó el 30 % de inhibición. Como control se empleó una solución de citocalasina B a una concentración de 25 µM, cuyo efecto inhibió el ensamblaje de actina en un

55 %. Por otro lado, ninguno de los compuestos estudiados mostró efectos en la polimerización de F-actina (datos no mostrados).

**Figura 70.** Efecto inhibitorio, en porcentaje, de los compuestos **42-45** (300  $\mu\text{M}$ ) sobre el ensamblaje de actina, *in vitro*, en comparación con la citocalasina B (25  $\mu\text{M}$ ). Los valores representan la media de tres experimentos independientes.

Para comprobar si el efecto del filtro interno debido a la absorbancia del ligando estaba implicado en la disminución de la emisión de fluorescencia de F-actina observada después de la adición de dicho ligando, se midió la absorbancia de las muestras a las longitudes de onda de excitación y emisión en ausencia de la proteína. Al ser todos los valores de absorbancia a una  $\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$  alrededor de 0.03 y 0.10, el efecto de filtro interno se pudo descartar.

## **5.6. Estudio de la conformación de los compuestos unidos a la actina.**

### **5.6.1. Modelado molecular.**

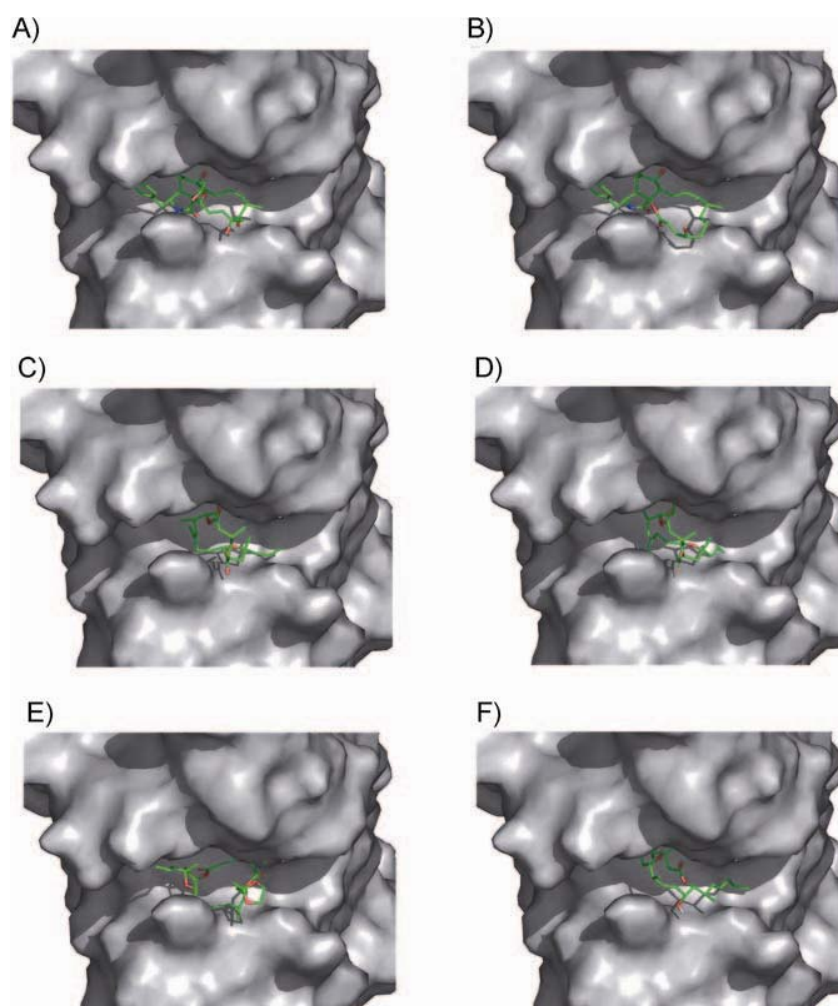
Para estudiar la localización de unión de los compuestos objeto de estudio a nivel del monómero de actina (G-actina) se contó con la colaboración del grupo de Profesor Villarasa, de la Universidad de Barcelona.

Entre las diferentes estructuras disponibles de G-actina en el PDB, se seleccionó aquella co-cristalizada con la citocalasina D (estructura 3EKS) (Nair



et al., 2008), al ser ésta la más adecuada para la evaluación del presente estudio.

Las simulaciones del modelado, llevadas a cabo mediante el programa AutoDock 3.05, mostraron una buena interacción de las moléculas **42-45** con G-actina. En los complejos predichos, las amfidinolidas examinadas se ajustaron bien en la cavidad relativamente hidrofóbica de G-actina donde se une la citocalasina D (Figura 71).



**Figura 71.** **A:** Complejo de G-actina con la citocalasina D conforme a la estructura 3EKS del PDB; **B:** Complejo de G-actina con citocalasina B; **C:** Complejo de G-actina con el compuesto **42**; **D:** Complejo de G-actina con el ligando **43**; **E:** Complejo de G-actina con el compuesto **44**; **F:** Complejo de G-actina con la molécula **44**. Las simulaciones del modelado, se llevaron a cabo mediante el programa AutoDock 3.05.

Además, se examinaron las interacciones de los compuestos en examen con los aminoácidos de G-actina. Se identificaron seis interacciones llave para citocalasina D (Nair et al., 2008): interacciones hidrofóbicas con Tyr169, Pro172, Met355 y Phe375, e interacciones de puentes de hidrógeno con Ile136 y Ala170.

En la tabla 32 se resumen las interacciones de la citocalasina D, B y de los agentes **42-45** con estos aminoácidos, tal como se detectó en los aductos predichos por AutoDock.

	Ile136 (H-bond)	Tyr169 (hydrophobic)	Ala170 (H-bond)	Pro172 (hydrop.)	Met355 (hydrop.)	Phe375 (hydrop.)
CyD	√	√	√	√	√	√
CyB	√	√	√	√	√	√
<b>42</b>	ND	√	√	√	√	√
<b>43</b>	ND	√	√	√	ND	√
<b>44</b>	ND	√	√	√	√	√
<b>45</b>	ND	√	√	√	ND	√

**Tabla 32.** Interacciones de citocalasina D (CyD), citocalasina B (CyB) y compuestos **42-45** con los aminoácidos de la molécula de G-actina.

Los resultados obtenidos indicaron, por tanto, que los filamentos de actina representaron, en realidad, la diana biológica de los compuestos estudiados de la familia de amfidinolidas.



## **Discusión**



## **1. Familia de dictiostatina y discodermolida.**

### **1.1. Los compuestos estudiados exhiben la capacidad de estabilizar los microtúbulos del huso mitótico, y vencen el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos (MDR) por todos los mecanismos conocidos: MDR, $\beta$ -III y mutaciones.**

La discodermolida y la dictiostatina han representado un ejemplo de moléculas capaces de estabilizar los microtúbulos de manera similar a la del paclitaxel con propiedades mejoradas (Florence et al., 2008). Sin embargo, a pesar del progreso significativo en la extracción y en las técnicas de purificación de discodermolida y dictiostatina, las bajas cantidades de productos extraídas a partir de las respectivas esponjas marinas, representaron un gran inconveniente para su producción, e hicieron que la caracterización estructural de estos productos naturales complejos y la determinación de sus perfiles biológicos resultasen difíciles. La síntesis química en laboratorio representa, por tanto, una de las claves para superar dichos inconvenientes, ya que permite tanto la obtención de productos naturales como de análogos estructurales que no están disponibles en la naturaleza, pero que pueden constituir herramientas valiosas para dar respuestas fundamentales en términos de relación estructura-actividad. Además, dichos análogos, a menudo, pueden revelarse incluso más activos que el producto original natural en sí mismo (Reymond and Cossy, 2008).

En el presente estudio se pretendió entender los mecanismos bioquímicos y biológicos que los moduladores de tubulina derivados de dictiostatina y discodermolida usan para regular los estados de activación de la tubulina, con el objeto de aportar informaciones que sirvan para diseñar moduladores con mejores propiedades bioquímicas y biológicas y, especialmente, que sean capaces de vencer el fenotipo de resistencia a drogas por todos los mecanismos conocidos: MDR,  $\beta$ -III y mutaciones.

Los ensayos de CI50 realizados para la caracterización de los derivados de la familia en examen, empleando células resistentes a fármacos por sobreexpresión de la glicoproteína-P, pusieron de manifiesto que todos los compuestos objeto de estudio, de la misma manera que sus moléculas de

referencia y que algunos de los agentes estabilizantes de microtúbulos más conocidos, tales como epotilona B y laulimalida (Gaitanos et al., 2004; Pryor et al., 2002), no son tan buenos sustratos para la gp-P como lo es el paclitaxel, o que su alta afinidad les permite evitar dicha bomba de membrana como demostró Matesanz et al., en 2008. La diferencia más notable observada entre los valores de citotoxicidad obtenidos, para los compuestos estudiados, residió en los análogos de dictiostatina **4** y **9**, y en el híbrido discodermolida/dictiostatina **12**, lo cual indica que es por su elevada afinidad, como se discutirá más adelante. Estos tres compuestos presentaron la mejor actividad citotóxica, mostrando valores de CI50 semejantes o más bajos que el taxano control y que las mismas moléculas parentales. Al contrario, los compuestos **2**, **7**, **16** y **17**, cuyo valor era hasta 5000 veces mayor que el de las correspondientes moléculas parentales de esta serie de productos de síntesis, resultaron ser los que menos efecto tuvieron en las condiciones experimentales ensayadas. Este hecho se correlaciona bien con los resultados obtenidos en microtúbulos *in vitro*. En cualquier caso, en estas células resistentes a paclitaxel, el resto de los derivados de discodermolida y dictiostatina estudiados resultaron ser citotóxicos a bajas concentraciones. Esta propiedad es importante en el desarrollo de dichos compuestos como medicamentos contra el cáncer. De este modo, las células tumorales que se vuelven resistentes a paclitaxel durante los prolongados periodos de tratamiento resultarían ser sensibles a la actividad de los agentes de la familia estudiada, restableciendo así una regresión del tumor inducida por fármacos; propiedad que se pierde cuando las células adquieren el fenotipo MDR. Como consecuencia, se pudo concluir que los compuestos investigados vencieron la resistencia a fármacos que confiere la gp-P y que el quimiotipo de dictiostatina/discodermolida muestra una eficacia prometedora en las células resistentes por MDR.

El segundo mecanismo por el cual los tumores se vuelven resistentes a los taxanos, en la quimioterapia del cáncer, es la sobreexpresión de los isotipos de tubulina con menor sensibilidad a dichos agentes. En los seres humanos, hay siete isotipos de  $\beta$ -tubulina y, de éstos, la clase del isotipo  $\beta$ -III se expresa a bajos niveles. En las células humanas normales y murinas, la clase del

isotipo  $\beta$ -I de tubulina es predominante, y representa aproximadamente el 70% de la  $\beta$ -tubulina total en todos los tejidos (Burgoyne et al., 1988; Wang et al., 1986). En contraste, la clase  $\beta$ -III de dicha proteína no se expresa habitualmente en un alto porcentaje en las células normales, aunque se ha encontrado que sí lo hace en las células tumorales resistentes a taxanos (Kavallaris et al., 1999). Muchos estudios preclínicos han demostrado que los altos niveles de expresión de la clase  $\beta$ -III de tubulina están asociados a la resistencia a paclitaxel en distintas líneas tumorales humanas ((pulmón (Burkhart et al., 2001), ovario (Kavallaris et al., 1997), próstata (Ranganathan et al., 1998), y mama (Kavallaris et al., 1997)) y a docetaxel en células tumorales humanas pancreáticas (Liu et al., 2001). Trabajos previos sugieren que la overexpresión del dicho isotipo podría alterar la unión del fármaco al dímero de tubulina (Giannakakou et al., 1997) o, alternativamente, que los microtúbulos de las células tumorales podrían tener diferentes propiedades dinámicas intrínsecas y, por lo tanto, ser menos sensibles a los agentes que tienen como diana la tubulina (Lu and Luduena, 1993; Banerjee et al., 1990). Otros estudios sugieren que la clase  $\beta$ -III de tubulina reduce la velocidad de polimerización de los microtúbulos, superando así el ensamblaje de dichos polímeros mediada por el paclitaxel (Hari et al., 2003). Kamath y sus colaboradores (Kamath et al., 2005) han demostrado que la sobreexpresión de la clase  $\beta$ -III induce resistencia a paclitaxel como consecuencia de una disminución en la eficacia de unión de este compuesto a dicho isotipo de tubulina, lo que resulta en un efecto supresor más débil por parte del ligando sobre la dinámica de los microtúbulos.

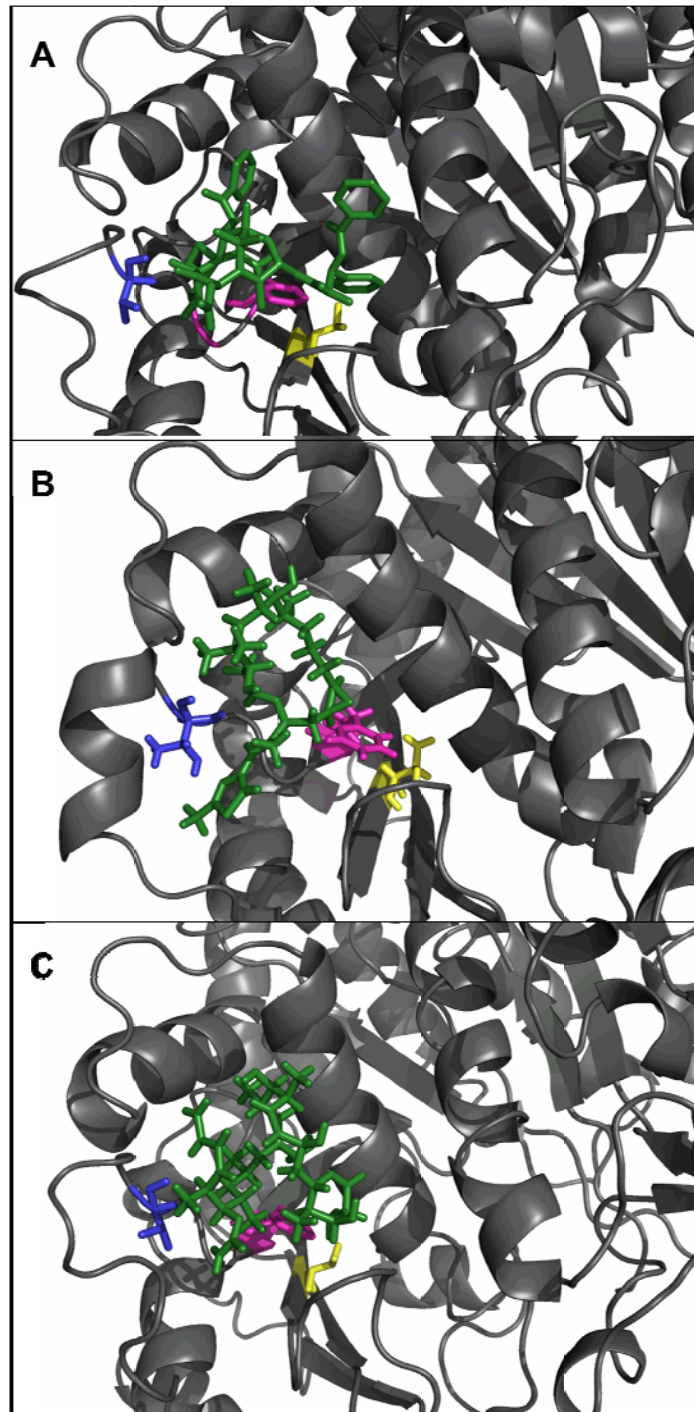
Los resultados del ensayo de MTT en presencia de las líneas humanas de carcinoma de cérvix, sensibles y resistentes a paclitaxel por sobreexpresión del isotipo  $\beta$ -III de tubulina, revelaron que los productos de síntesis investigados muestran una elevada actividad citotóxica. Como en el caso anterior, los derivados más potentes fueron los ligandos **4**, **9** y **12**. Los valores de los índices de resistencia, obtenidos para la pareja de líneas celulares empleadas, indicaron que las moléculas de la familia de dictioestatina y discodermolida fueron capaces de vencer la presencia del fenotipo de



resistencia a paclitaxel en las células resistentes, indicando que la presencia del isotipo  $\beta$ -III de tubulina no afecta a los ligandos del “sitio” de discodermolida y dictiostatina. Como consecuencia, se puede especular su potencial efecto sinérgico a este nivel.

Adicionalmente a la resistencia múltiple a drogas conferida por la bomba de membrana gp-P y a paclitaxel por sobreexpresión del isotipo  $\beta$ -III de tubulina discutidas anteriormente, se han descrito también resistencias a fármacos causadas por mutaciones en la molécula de tubulina (Monzo et al., 1999). Aunque la importancia clínica de este caso ha sido puesta previamente en duda en algunos trabajos (Mesquita et al., 2005), se encuentran ejemplos *in vitro* (Giannakakou et al., 1997; Schibler y Cabral, 1986), de modo que la discusión sobre su aparición en pacientes sigue vigente (Berrieman et al., 2004; Orr et al., 2003; Pusztai, 2007); aunque, en cualquier caso, su incidencia no debe ser mayoritaria (Hasegawa et al., 2002; Lamendola et al., 2003). Con este propósito, nos preguntamos si los compuestos objeto de estudio, que tan buenos resultados tienen en el mantenimiento de su toxicidad sobre células con altos niveles de expresión de la gp-P o del isotipo  $\beta$ -III de tubulina, son también capaces de conservar dicha actividad en células cuya resistencia a fármacos viene dada por la aparición de mutaciones en su tubulina. Con este objetivo, probamos nuestros compuestos en tres clones de 1A9 mutados en la subunidad  $\beta$  de la proteína. Por una parte, en las células A8, cuya mutación en  $\beta$  tubulina (Thr274 está sustituida por Ile) les confiere resistencia a epotilona A (Wang et al., 2005), pero sin apenas mostrar diferencias en su sensibilidad a paclitaxel respecto a la línea celular parental con tubulina silvestre; hechos que pudieron comprobarse con los compuestos de este estudio (con excepción de algunos ligandos muy pocos activos, **2**, **7**, **15**, **16** y **17**). Por otra parte, probamos los clones PTX10 y PTX22, líneas celulares resistentes a paclitaxel (Giannakakou et al., 1997). En ambos casos, encontramos modificaciones que mejoraban notablemente el índice de resistencia respecto al paclitaxel e incluso, en algunos casos, resultaban en mayores toxicidades sobre las células con las tubulinas mutantes. Por tanto, la mayoría de los compuestos de la

familia en examen no se vio afectada por la serie de mutaciones en  $\beta$ -tubulina que aumentan la resistencia de las células a paclitaxel y/o a epotilona A (Gaitanos et al., 2004), a pesar del hecho de que, como se discutirá más adelante, los ligandos investigados compiten con paclitaxel para la unión a los microtúbulos de la misma manera que la discodermolida y la dictiostatina (Pryor et al., 2002; Kowalski et al., 1997; Buey et al., 2005). Estos resultados podrían indicar que, presumiblemente, las sustituciones específicas de aminoácidos no están directamente involucradas en la unión de los ligandos estudiados a los microtúbulos. La figura 72 muestra los aminoácidos modificados del sitio de unión de los taxanos en la subunidad  $\beta$  de la tubulina en las tres líneas mutantes de 1A9 empleadas en el presente trabajo. La comparación entre la unión del paclitaxel, epotilona A y discodermolida al sitio del paclitaxel en la tubulina pone de manifiesto que cada una de dichas modificaciones afecta de manera diferente la unión de los tres compuestos analizados a los microtúbulos y, por lo tanto, justifica los resultados obtenidos.



**Figura 72.** Comparación entre **(A)** la unión del paclitaxel (Nogales et al., 1995), **(B)** epotilona A (Prota et al., 2013) y **(C)** discodermolida (dato no publicado) al sitio de unión de los taxanos en la subunidad  $\beta$  de tubulina. Diagrama de cintas mostrando las hélices  $\alpha$ , las láminas  $\beta$  y los *loops* en gris. El paclitaxel, la epotilona A y la discodermolida se muestran en verde. Se indican los diferentes aminoácidos modificados en dicho sitio de unión, en las líneas mutadas de 1A9: Phe270Val (morado) en PTX10, Thr364Ala en PTX22 (amarillo) y Thr274Ile (azul marino) en A8.

Los ensayos de inmunofluorescencia llevados a cabo pusieron de manifiesto que los compuestos examinados indujeron la desorganización de la red microtubular y, en la mayoría de los casos, la aparición de haces de microtúbulos, hecho por el que dichos derivados se clasificaron como MSA. Su actividad a nivel del huso mitótico en las células en división se mostró tan potente (y en algunos casos incluso más) como aquella previamente descrita en presencia de las moléculas parentales y del paclitaxel (Buey et al., 2005). La hidrogenación del doble enlace en posición C2-C3 (**6**), la sustitución de un -OH por un -OMe en posición C9 (**9**) y la adición de un doble enlace en posición C4-C5 (**12**) se evidenciaron como las mejores modificaciones para la actividad estabilizadora de los compuestos estudiados.

Asimismo estos resultados se ampliaron con el estudio del ciclo celular en las líneas celulares A2780, A2780AD y A549. En los tres casos se observó la acumulación en G<sub>2</sub>/M de las células ensayadas, corroborando la capacidad antimitótica de los derivados en examen y la potencia de estos agentes de vencer la resistencia a fármacos. En este ensayo, las modificaciones de los ligandos **4**, **6**, **9** y **12** resultaron también ser las que mayoritariamente mejoraron (sobre todo en comparación con el paclitaxel) o mantuvieron (en comparación con los compuestos originales) la actividad de los productos de síntesis a nivel celular.

### **1.2. La mayoría de los compuestos seleccionados de la familia de dictiostatina y discodermolida interaccionan sinérgicamente con otros agentes estabilizantes de microtubulos (MSA), tales como paclitaxel y pelorusido A.**

En los últimos años la terapia de combinación ha adquirido más importancia en clínica, aunque es aconsejable cierta cautela. La combinación de dos fármacos puede llevar a toxicidades adicionales. Esta circunstancia fue encontrada en un estudio preclínico en presencia de docetaxel y vinorelbina (Delord et al., 2007). En la mayoría de los estudios a este nivel se utilizan combinaciones de dos fármacos que se dirigen a dos vías independientes, por ejemplo paclitaxel en combinación con fármacos que contienen platino tales como nedaplatino o

carboplatino (Belani et al., 2008; Okuda et al., 2008). La sinergia entre dos fármacos con el mismo mecanismo de acción, por ejemplo, pelorusido y paclitaxel, también podría resultar de utilidad clínica, ya que sería necesaria una cantidad menor de cada fármaco para alcanzar una concentración mínima efectiva en la sangre. Trabajos previos en ratones sugieren que la combinación de dos MSA que se unen al mismo sitio en  $\beta$ -tubulina, como paclitaxel y discodermolida, también pueden actuar sinérgicamente en la reducción del tamaño del tumor en dichos animales (Huang et al., 2006). Al contrario, ulteriores estudios revelan que, *in vitro*, agentes estabilizantes de microtúbulos que tienen diferentes sitios de unión muestran sinergia entre ellos en la polimerización de la tubulina; mientras que dos MSA que se unen al mismo sitio en la tubulina no son sinérgicos (Gapud et al., 2004; Hamel et al., 2006). Sin embargo, otros estudios de sinergia en células confirman que MSA que se unen al mismo sitio, por ejemplo, paclitaxel y discodermolida, pueden interaccionar sinérgicamente (Honore et al., 2004; Martello et al., 2000). Dicha interacción sinérgica entre paclitaxel y discodermolida, en las células, se corroboró en el presente estudio.

Esta diferencia, *in vitro* y a nivel celular, se debe a que el efecto de los compuestos es estequiométrico en tubulina pura, por tanto todos los sitios de unión en los microtúbulos estarán ocupados por el compuesto de mayor afinidad, no quedando ninguno de dichos sitios disponible para la unión de otro ligando de menor afinidad. Al contrario, en las células el efecto de los compuestos es subestequiométrico y, por tanto, una vez unídose el agente más afín a sus sitios en los polímeros, seguirán quedando sitios de unión disponibles para un segundo compuesto de menor afinidad.

Además, este resultado se podría explicar por las diferencias en las configuraciones de los enlaces a pesar de la unión al mismo sitio (Khrapunovich-Baine et al., 2009). Sin embargo, esta circunstancia no tiene en cuenta la falta de sinergia observada entre estos dos fármacos en estudios con tubulina pura (Hamel et al., 2006). Las mismas interacciones sinérgicas que las observadas entre paclitaxel y discodermolida se encontraron también en presencia del paclitaxel y de los derivados de la familia objeto de estudio, en

las células ensayadas en el presente trabajo. La única excepción encontrada fue aquella en relación a la combinación entre el paclitaxel y el análogo de dictiostatina (**10**). Estos datos confirmarían los resultados obtenidos en las células PTX10 y PTX22 para los compuestos ensayados, evidenciando que la unión de dichos compuestos a los microtúbulos no es exactamente solapante con el sitio del paclitaxel.

Una condición inesperada, en nuestro estudio, fue la de que el pelorusido A no interaccionó sinérgicamente con un MSA que se une al sitio del paclitaxel en los microtúbulos, la epotilona A, a diferencia de lo previamente encontrado en otras líneas celulares (Wilmes et al., 2010). Esta circunstancia indica que sitios de unión diferentes no son factores suficientes para crear sinergias entre distintos MSA, y que quizás otros factores u objetivos secundarios de cada fármaco podrían ser, también, importantes en dicha interacción. Las razones de la falta de sinergia, en el presente estudio, entre pelorusido A y epotilona A, así como entre pelorusido A y el híbrido **12** de discodermolida y dictiostatina, podrían ser debidas a diferentes perfiles en la actividad o bien de los propios medicamentos en los objetivos primarios o secundarios, o bien de las líneas celulares ensayadas. Aunque las diferencias en los sitios de unión, por ejemplo, entre pelorusido A y epotilona A, parecen explicar adecuadamente las interacciones sinérgicas previamente descritas (Gapud et al., 2004) en la polimerización de la tubulina, dichas interacciones parecen ser más complejas en los cultivos celulares. Estudios previos indican distintas conformaciones de unión posibles dentro de un solo sitio, por ejemplo en el sitio del paclitaxel (paclitaxel y discodermolida) (Khrapunovich-Baine et al., 2009), o un nuevo mecanismo de estabilización en el sitio de unión de pelorusido/laulimalida (Huzil, et al., 2008); aunque estas diferencias también deberían afectar entonces a la sinergia en los estudios bioquímicos previamente descritos (Gapud et al., 2004). Existen también pruebas que sostienen que los fármacos del sitio de los taxanos presentan efectos muy diferentes en la polimerización de tubulina y que pueden interactuar con diferentes isotipos de  $\beta$ -tubulina (Gertsch et al., 2009). Estos hechos podrían explicar las diferencias entre las líneas celulares que expresan su propia y

única composición de isotipo de tubulina. Otros factores probablemente también juegan un papel en las interacciones sinérgicas, incluidas las diferencias en los efectos del fármaco sobre las proteínas asociadas a los microtúbulos o potenciales destinos secundarios (Wilmes et al., 2010). Incluso, la actividad de la bomba de membrana gp-P se relacionó con los efectos sinérgicos (Budman and Calabro, 2002). Así, cada MSA tendría su propio perfil de sinergia con otros fármacos y en diferentes líneas celulares que determinaría si las interacciones sinérgicas ocurren o no.

Las interacciones químicas entre las combinaciones de fármacos son muy complejas; y los mecanismos detrás de dicha sinergia son en gran parte aún desconocidos y dependerían realmente de muchas variables del cultivo. El grado de sinergia debe ser dependiente de las combinaciones ensayadas, puesto que una concentración demasiado baja no permitiría lograr un efecto, mientras que una concentración demasiado alta daría la respuesta máxima antes de la adición del segundo fármaco de la combinación. Otra explicación para la sinergia podría ser la cooperatividad entre los dos agentes empleados, de forma que al unirse uno de los dos fármacos induciría un pequeño cambio conformacional en la tubulina que aumentaría la afinidad de unión del segundo agente (Hamel et al., 2006; Martello et al., 2004; Honore et al., 2011).

**1.3. Los agentes en estudio alteran el estado de agregación de la tubulina, promoviendo la formación de los microtúbulos *in vitro*, e inhiben fuertemente la unión del paclitaxel a su sitio.**

**Al igual que el paclitaxel, los ligandos que se unen al mismo sitio muestran una marcada dependencia de la afinidad con la temperatura.**

Con el fin de confirmar la actividad estabilizante de los derivados de la familia de dictiostatina y discodermolida estudiados, se llevaron a cabo estudios que permitieron evaluar la potencia de los ligandos en la modulación del ensamblaje de tubulina, así como ensayos de desplazamiento del flutax-2 (análogo del paclitaxel) y de epotilona B (ligando que se une al sitio del paclitaxel en los microtúbulos con una afinidad mayor que la del flutax-2) para analizar el sitio de unión de dichos compuestos en los polímeros.

Los ensayos de modulación del ensamblaje de tubulina por ligando pusieron de manifiesto la actividad estabilizadora de microtúbulos *in vitro* de la serie de compuestos estudiada, puesto que disminuyeron el valor de la concentración crítica de tubulina (Cr) de la misma forma que los agentes estabilizantes de microtúbulos conocidos (paclitaxel, dictiostatina, discodermolida, etc.) (Buey et al., 2005). Todos los compuestos examinados, a excepción de los ligandos **2** y **17**, mostraron una potencia muy elevada en la inducción de dicho ensamblaje. Sin embargo, el escaso efecto de estos dos ligandos se correlaciona bien con los valores obtenidos en los ensayos celulares, discutidos anteriormente. De todas formas, los datos obtenidos sugieren que la actividad estabilizadora de microtúbulos por parte de todos los compuestos bajo análisis se produce por interacción directa con el citoesqueleto de los microtúbulos.

El estudio de la interacción entre los ligandos del sitio del paclitaxel y los microtúbulos se ha visto dificultado durante años por su mecanismo de acción: dado que estos ligandos se unen preferentemente a la forma ensamblada de tubulina induciendo el ensamblaje de microtúbulos, la unión y el ensamblaje son reacciones ligadas (Díaz et al., 1993). Debido a esta propiedad, aunque se puede ensamblar tubulina y obtener sitios de paclitaxel vacíos en ausencia de ligandos inductores del ensamblaje a concentraciones altas de tubulina, la elevada afinidad de estos compuestos hace imposible encontrar condiciones en las que la reacción de unión (ligando-microtúbulo) no esté totalmente desplazada hacia el estado unido. En estas circunstancias se hace muy difícil la determinación de la afinidad de los ligandos en estudio. Es decir, como consecuencia del acoplamiento entre la unión de un ligando y el ensamblaje de microtúbulos inducido por éste, en las condiciones experimentales usuales, la unión intrínseca no puede darse de manera aislada, impidiendo así la determinación de las constantes de unión. Como consecuencia, para medir la afinidad de los ligandos fue necesario usar microtúbulos estabilizados (estables a bajas temperaturas y a bajas concentraciones) mediante entrecruzamiento con glutaraldehído (Andreu and Barasoain, 2001; Díaz et al., 2000). El uso de estos microtúbulos estabilizados nos permitió, por un lado, aislar la unión del



ligando al microtúbulo y, por otro, usar concentraciones lo suficientemente bajas como para que el equilibrio de unión no esté totalmente desplazado hacia el estado unido. Usando estos microtúbulos estabilizados, se consiguió medir directamente la afinidad de unión al sitio del paclitaxel de un derivado fluorescente de éste, flutax-2 (Díaz et al., 2000) y utilizar un método de competición, previamente desarrollado por nuestro grupo, para medir la afinidad de los compuestos que se unen a este sitio y diferenciarlos de aquéllos que no lo hacen (Díaz and Buey, 2007). En este estudio, los productos cuya afinidad se manifestó muy alta y, como consecuencia, la medida de su constante de unión poco precisa (**4**, **6**, **9** y **12**) se midieron mediante un ensayo de desplazamiento de epotilona B (Díaz and Buey, 2007). Los resultados obtenidos confirmaron que el sitio del paclitaxel representa la diana de unión de los productos ensayados, de la misma manera que los ligandos dictiostatina y discodermolida estudiados previamente (Buey et al., 2005).

A partir de las constantes de afinidad obtenidas a diferentes temperaturas se calcularon los parámetros termodinámicos de la unión de los compuestos a los microtúbulos, usando para ello las ecuaciones de Van't Hoff y de Gibbs. De esta manera se determinaron los cambios producidos por cada modificación sencilla de la molécula en la energía libre de unión, de modo que se pudieron seleccionar las sustituciones más favorables en cada posición que hagan posible el sucesivo diseño de agentes estabilizantes de microtúbulos optimizados.

Al igual que el paclitaxel, los ligandos en estudio mostraron una marcada dependencia de la afinidad con la temperatura (Tablas 16 y 17 Resultados). La reacción es exotérmica y dirigida por entalpía para todos los compuestos, es decir, la constante de afinidad disminuye a medida que aumenta la temperatura, a excepción de los casos de los productos de síntesis **2** y **17** (en los cuales dicha afinidad se mantiene constante). La reacción de unión tiene una contribución entrópica negativa a la energía libre de unión para el paclitaxel, el docetaxel y los ligandos **4**, **6**, **9**, **12** y **14**. El resto de compuestos tienen una contribución entrópica positiva a la energía libre de unión. Esto es especialmente notable para los derivados **5** y **15**, unos ligandos que deberían

tener una elevada flexibilidad conformacional en disolución dada su estructura química, pero que sin embargo muestran una elevada contribución entrópica a la energía libre de unión, de la misma forma que el ligando de referencia **3** (Tabla 18 Resultados). Considerando los resultados obtenidos de entropía y entalpía, los compuestos **4**, **6**, **9** y **12** mostraron los mejores resultados de energía libre ( $\Delta G$ ).

#### **1.4. Los valores de citotoxicidad obtenidos en presencia de los ligandos objeto de estudio se correlacionan bien con las respectivas afinidades de dichos compuestos con los microtúbulos.**

Se ha observado que para los compuestos del sitio de unión de paclitaxel, la citotoxicidad y la afinidad de unión a los microtubulos están relacionadas entre ellas, siendo la constante de unión una buena predictora de la capacidad inhibitoria de dichos ligandos en células. En cualquier caso, hay un límite en la CI50. Trabajos anteriores (Buey et al., 2004; Buey et al., 2005; Matesanz et al., 2008) indican que, a pesar de ser posible alcanzar afinidades de unión muy elevadas, existe un límite en la capacidad citotóxica que puede ser lograda en presencia de los compuestos. Estos datos muestran también que un porcentaje significativo de tubulina dentro de la célula debe estar unida al ligando para detener el ciclo celular y, por tanto, la citotoxicidad estaría limitada por la cantidad de compuesto que se necesita para alcanzar dicho porcentaje.

A la concentración de droga necesaria para detener la progresión del ciclo celular (o la CI50), el porcentaje de tubulina unida por el ligando está en el rango del 2-20 % (es decir, comparable, a un tercio de la proteína disponible); valor que impone un límite de citotoxicidad en el rango de nM (Matesanz et al., 2008).

Si para que el paclitaxel ejerza su citotoxicidad necesita unir un porcentaje significativo de la tubulina citoplásmica (por ejemplo, entre un 2 y 5 %), y la cantidad de ligando disponible para unirse a la proteína es una pequeña parte (2-10 %) del total de la concentración de 1 nM (lo que ya supone un tercio de la tubulina celular), se deduce que para un agente estabilizante de

microtúbulos, con un mecanismo de acción como el de los taxanos, el límite de concentración para su citotoxicidad estará en 0.1-1 nM.

Como consecuencia, es especialmente notable que las IC<sub>50</sub> de muchos de los compuestos sean muchos más bajas que sus constantes de unión (como puede ser el caso de la discodermolida). Esto implicaría que, a menos que la concentración local en el interior de las células sea mayor que en el medio de cultivo, solo una pequeña fracción de las moléculas de ligando estarían unidas a los microtúbulos. Se puede, por tanto, indicar que a concentraciones próximas a las IC<sub>50</sub>, la concentración crítica del ensamblaje de tubulina no se verá afectada por la presencia del compuesto. Esto corrobora el hecho de que los productos del sitio del paclitaxel, a muy bajas concentraciones, ejercen su efecto citotóxico mediante el bloqueo de la dinámica de los microtúbulos, sin aumentar la masa total de estos (Torres and Horwitz, 1998), como se ha comentado en Introducción.

Como conclusión, por tanto, se puede decir que para mejorar el diseño racional de ligandos del sitio del paclitaxel no se deben buscar moléculas con valores de IC<sub>50</sub> muy bajos (que en muchos casos resultan ser, además, compuestos muy tóxicos, incluso para las células normales), sino conseguir productos que presenten una afinidad de unión maximizada. Dicha maximización conlleva la mejora del efecto de dichos compuestos en líneas celulares sensibles y resistentes por sobreexpresión de la gp-P, pues en estas últimas la concentración de ligando intracelular libre es baja siendo, por tanto, difícil para la gp-P expulsarlo del medio celular.

Considerando, por tanto, los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observa que, aunque se registren valores muy altos de afinidad de unión por los microtúbulos en presencia de los compuestos investigados, sólo en algunos casos se consiguen aumentos significativos de la citotoxicidad en las células sensibles ensayadas. Sin embargo, en las células resistentes a fármacos por sobreexpresión de la gp-P utilizadas, la concentración intracelular de las drogas está muy reducida como consecuencia de dicha sobreexpresión de la bomba de membrana, lo que permite que el incremento de afinidad logrado en

presencia de los derivados **4, 6, 9 y 12** se refleje en unas mejores propiedades citotóxicas en dichas células resistentes.

Con todas estas premisas, se pudo concluir que todos los valores de las constantes de afinidad de los productos investigados se correlacionaron muy bien con aquéllos de las respectivas actividades citotóxicas de dichos ligandos.

### **1.5. Influencia de las modificaciones en la actividad de los compuestos.**

Con los resultados celulares y bioquímicos obtenidos, por tanto, se puede determinar la relación estructura-actividad de los distintos derivados de la familia de dictiostatina y discodermolida estudiados, evidenciando si cada modificación estructural mejora o no la actividad de dichos productos, y, en caso afirmativo, de qué modo lo hace.

**1.5.1. Entre las distintas modificaciones estructurales realizadas, la eliminación del metilo en posición C6, la hidrogenación del doble enlace en posición C2-C3, la sustitución de un -OH por un -OMe en posición C9 y la adición de un doble enlace en posición C4-C5 mejoran la actividad de los productos de síntesis 4, 6, 9 y 12, respectivamente, en comparación con las moléculas base.**

Dado que todos los derivados de la familia de dictiostatina y discodermolida se pueden relacionar entre sí por modificaciones simples en su estructura, es posible cuantificar la contribución al incremento de energía libre de unión del grupo modificado (Figura 73, A y B). El cambio del incremento en energía libre asociado con la modificación del ligando A para dar el ligando B, puede ser definido como:

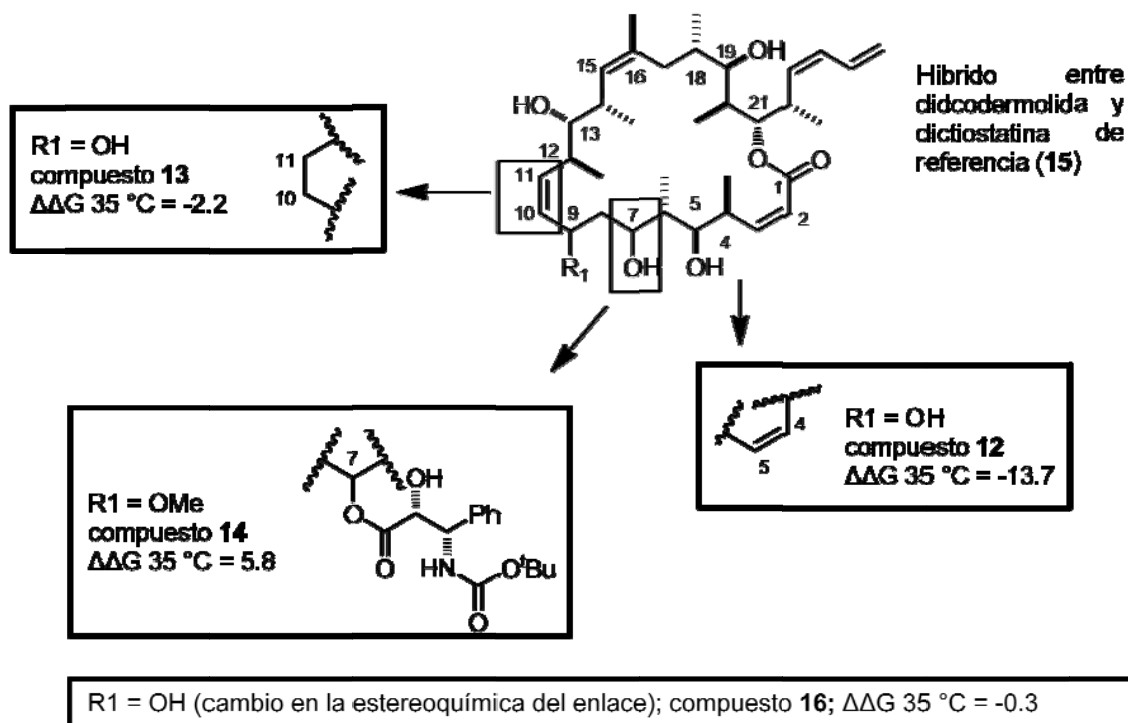
$$\Delta\Delta G (A \rightarrow B) = \Delta G (B) - \Delta G (A).$$

Cuanto más negativo sea el  $\Delta\Delta G$ , mejor será la modificación realizada.



## B

### Híbridos discodermolida/dictiostatina



**Figura 73.** Representación esquemática de los grupos modificados en las moléculas base de la familia de dictiostatina y discodermolida. **A:** Análogos de dictiostatina. **B:** Híbridos discodermolida/dictiostatina. Se indican los valores de variación de energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) a 35 °C dependiendo de sus modificaciones sencillas.

En el caso de los análogos de dictiostatina, el cambio del grupo funcional éster de la posición C21 a la C19 (1→2,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 21.6 kJ mol<sup>-1</sup>), la modificación en la estereoquímica del enlace en C9 y la eliminación del metilo en posición C16 (1→7,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 14.7 kJ mol<sup>-1</sup>), así como el cambio en la estereoquímica del enlace en posición C12 y C13 (1→17,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 18.4 kJ mol<sup>-1</sup>) determinan una afinidad de unión a los microtúbulos mucho más baja que el compuesto de referencia (1) y, por lo comentado anteriormente, la necesidad de una concentración mucho más alta para actuar a nivel celular; por lo que se puede concluir en base a lo ya comentado anteriormente, que éstas modificaciones son desfavorables para las propiedades antitumorales del ligando. De la misma manera, los híbridos discodermolida/dictiostatina, los

compuestos **15** (híbrido entre discodermolida y dictiostatina de referencia) y **16** (cambio en la estereoquímica del enlace -OH en posición C9; **15**→**16**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = -0.3 kJ mol<sup>-1</sup>) no mejoran ni la unión ni la actividad celular de los respectivos ligandos parentales, resultando ser ligandos de baja afinidad. Por tanto, estos resultados sugieren que dichas modificaciones tampoco son favorables o que la estructura del compuesto resultante no es compatible con el sitio de unión.

Al igual que estos últimos agentes, la hidrogenación del doble enlace en posición C10-C11 (**15**→**13**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = -2.2 kJ mol<sup>-1</sup>), la sustitución del grupo -OH por un -OMe en posición C9 y la esterificación del hidroxilo en posición C7 (**15**→**14**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 5.8 kJ mol<sup>-1</sup>), así como el cambio en la estereoquímica del enlace en posición C9 (**1**→**11**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 10.8 kJ mol<sup>-1</sup>), aunque mejoraron ligeramente la citotoxicidad de dichas moléculas con respecto a los híbridos mencionados anteriormente, se caracterizaron por valores muy bajos de afinidad para los microtúbulos. Estos resultados, por tanto, demuestran la importancia de los grupos modificados en las estructuras originales.

De manera bastante parecida a los ligandos anteriores, la hidrogenación del doble enlace en posición C10-C11 (**1**→**5**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 5.5 kJ mol<sup>-1</sup>), aquélla con dos dobles enlaces conjugados en posición C2-C3 y C4-C5 (**1**→**8**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 6.3 kJ mol<sup>-1</sup>), y la eliminación del metilo en posición C16 (**1**→**10**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = 9.1 kJ mol<sup>-1</sup>), aunque fueron modificaciones favorables para la actividad citotóxica de los análogos de dictiostatina, perjudicaron la potencia de la unión de dichos análogos a su diana.

Por el contrario, en la evaluación de los resultados obtenidos en los ensayos celulares, así como en los ensayos bioquímicos, las mejores combinaciones, consecuentes a las modificaciones de las moléculas naturales, se observaron en presencia de los compuestos **4** (eliminación del metilo en posición C6; **1**→**4**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = -2.7 kJ mol<sup>-1</sup>), **6** (hidrogenación del doble enlace en posición C2-C3; (**1**→**6**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = -1.4 kJ mol<sup>-1</sup>), **9** (sustitución de un -OH por un -OMe en posición C9; **1**→**9**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = -4.6 kJ mol<sup>-1</sup>) y **12** (adición de un doble enlace en posición C4-C5; **1**→**12**,  $\Delta\Delta G$  35 °C = -13.7 kJ mol<sup>-1</sup>). Dichos productos de síntesis, en todas las líneas celulares ensayadas,

sensibles y resistentes a quimioterapia por todos los mecanismos conocidos (MDR,  $\beta$ -III y mutaciones), mostraron un potente efecto citotóxico. Dicha potencia en la actividad se correlacionó perfectamente con los valores de constantes de unión a microtúbulos obtenidos en los ensayos de desplazamiento de epotilona B del sitio del paclitaxel en dichos polímeros.

#### **1.6. La discodermolida se une y cosedimenta con la tubulina dimérica.**

Como se ha comentado en el apartado Resultados, los agentes estabilizantes de microtúbulos son capaces de inducir el ensamblaje de microtúbulos en condiciones en que la tubulina misma es incapaz de ensamblar (unión de GDP y ausencia de  $Mg^{2+}$ ). No obstante, aunque la unión de estos agentes a la tubulina no polimerizada es esencial para explicar su modo de acción (Buey et al., 2005; Buey et al., 2004; Díaz et al., 1993), la demostración experimental inequívoca de esta unión resultó difícil de alcanzar hasta el desarrollo del presente trabajo. De hecho, esta unión se puso de manifiesto, en estudios previos, sólo por marcaje covalente del sitio del poro empleando el compuesto ciclostreptina (Buey et al., 2007). Sin embargo, la interacción reversible de los compuestos estabilizantes de microtúbulos con el heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina en su estado no polimerizado nunca había podido observarse directamente.

Indudablemente, para estabilizar los microtúbulos se requiere que la afinidad de unión del compuesto para el estado ensamblado sea mucho más alta que para la forma no ensamblada, desplazando para ello el equilibrio de ensamblaje hacia el polímero. Por lo tanto, se puede predecir la existencia de baja afinidad de los MSA para el heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina no ensamblada. Esta baja afinidad impidió la detección previa de la unión de los agentes estabilizantes de microtúbulos, como paclitaxel o docetaxel, al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina mediante técnicas de centrifugación (Díaz et al., 1993). Cabe destacar que, en el presente trabajo, el uso de agentes estabilizadores de microtúbulos con mayor solubilidad acuosa, como discodermolida, ha permitido la primera detección experimental de la unión a la tubulina dimérica, así como la caracterización bioquímica y estructural de dicha interacción.



El resultado del experimento de centrifugación indicó que la discodermolida cosedimentó con el heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina no polimerizada en una condición en la que la tubulina no se encuentra polimerizada (ausencia de  $Mg^{2+}$ ) (Andreu et al., 1989). Sin embargo, dada la baja afinidad de unión observada, no se alcanzó la saturación a la concentración máxima posible de ligando, y por este motivo no pudo ser determinada la estequiometría de la interacción. Sin embargo, como consecuencia del análisis de Scatchard, se asumió una estequiometría de 1:1 y una constante de unión de  $2.0 \pm 0.7 \times 10^4 M^{-1}$ .

#### **1.7. Los productos investigados, a excepción de la molécula parental **3** y del híbrido discodermolida/dictiostatina **15**, no modifican la estructura de los microtúbulos.**

La presencia de taxanos afecta al número de protofilamentos que componen un microtúbulo, siendo además este número diferente dependiendo del taxano utilizado (paclitaxel, docetaxel, flutax-1 y flutax-2) (Andreu et al., 1994; Díaz et al., 2000). Disponiendo de distintos compuestos modificados estructuralmente, quisimos indagar sobre la influencia de dichas modificaciones en el diámetro de los microtúbulos que ensamblan. Desafortunadamente, las cantidades de productos disponibles no fueron suficientes para obtener datos de la serie completa de los ligandos bajo estudio.

A pesar de ello, los datos obtenidos indicaron que, entre los ligandos en examen, solamente el compuesto parental **3** y el híbrido discodermolida/dictiostatina **15** parecieron provocar los mayores cambios sobre el diámetro de los microtúbulos cuya polimerización inducen (Tabla 19 Resultados). El resto de agentes analizados no modificó el ángulo que pueden formar los protofilamentos entre sí; no cambiando, por tanto, el número de ellos capaz de cerrar el cilindro. Es posible que este hecho sea consecuencia del modo de unión de los compuestos a su sitio en los microtúbulos. Se especula que los compuestos modificados estudiados no alteran la estructura del loop-M y, por tanto, no modifican la interacción entre los protofilamentos.

**1.8. La combinación entre los datos experimentales de TR-NOE y de RMN STD y los cálculos de CORCEMA-ST indican que la discodermolida se une a un sitio adicional en el poro tipo I de los microtúbulos. Dicho sitio es diferente del sitio de unión luminal.**

Los agentes estabilizantes de microtúbulos se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su unión a los diferentes sitios conocidos en los microtúbulos. El primer grupo incluye paclitaxel y sus biomiméticos (docetaxel, epotilonas, discodermolida, dictiostatina, ciclostreptina, etc.) (Buey et al., 2005). El segundo incluye laulimalida y pelorusido, cuyo sitio de unión se discutirá más adelante. En el primer caso, dichas moléculas se unen competitivamente a uno o ambos sitios de unión presentes en el lumen (sitio interno de la subunidad  $\beta$  de tubulina) y en el poro de los microtúbulos (sitio externo, implicando la participación de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de heterodímeros diferentes). Trabajos previos de nuestro grupo proponen que estos ligandos se unen, en primer lugar, al sitio externo facilitando, como consecuencia, el transporte de los compuestos al sitio luminal. Ulteriores estudios muestran que un taxoide fluorescente (hexaflutax) es capaz de unirse exclusivamente en el sitio externo en los microtúbulos, y que la unión a este sitio del poro es suficiente para inducir el ensamblaje de los microtúbulos (Díaz et al., 2005; Barasoain et al., 2010). Además, la unión a los microtúbulos de la ciclostreptina (un MSA que se une covalentemente a la tubulina), cuya unión ha sido caracterizada por espectrometría de masas, mostró que este ligando se une tanto al sitio interno como al sitio del poro (Buey et al., 2007).

Hasta el desarrollo del presente trabajo, no se había establecido aún si otros agentes estabilizantes de los microtúbulos que tienen como diana el sitio del paclitaxel se unían sólo al sitio interno, sólo al externo, o a ambos sitios de unión. Sin embargo, su estricta estequiometría 1:1 con respecto al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina indica que la unión a ambos sitios es mutuamente exclusiva (Buey et al., 2005; Díaz et al., 1993; Buey et al., 2004). Además, evidencias indirectas apoyan la presencia de un sitio de unión en el poro con afinidad moderada para los MSA.

Se sabe que se requiere una rápida cinética de disociación en la escala de tiempo de relajación del NMR para observar señales TR-NOESY. Estudios previos muestran que es posible obtener señales intensas de TR-NOESY para docetaxel y discodermolida unidos a los microtúbulos (Canales et al., 2008). Por tanto, es probable que un sitio de unión con una afinidad más baja que el sitio de unión luminal, también esté implicado en el reconocimiento de estos compuestos.

En resumen, se han descrito para los biomiméticos del paclitaxel dos diferentes sitios de unión en los microtúbulos: el sitio del poro, donde tiene lugar la unión de la ciclostreptina (Buey et al., 2007) y del hexaflutax (Barasoain et al., 2010), y el sitio luminal interno, donde se une el mismo paclitaxel (Nogales et al., 1999; Lowe et al., 2001). Una vez que se han formado los microtúbulos, se esperaría que el paclitaxel y sus miméticos debieran estar unidos principalmente al sitio interno de alta afinidad. En principio, la existencia de un sitio de alta afinidad impide el uso de técnicas de RMN, tales como TR-NOESY y STD, para monitorizar las interacciones de los ligandos, debido al requerimiento de una cinética de disociación rápida de los ligandos para que estos experimentos permitieran obtener una estructura. Por lo tanto, era altamente probable que los eventos de unión asociados a este sitio luminal de alta afinidad no permitiesen observar ninguna señal. Sin embargo, en el presente estudio, los experimentos de RMN produjeron señales para la discodermolida en presencia de los microtúbulos. Por lo tanto, parece muy probable que las señales de los experimentos de TR-NOESY y STD observados surjan de un evento alternativo de unión, probablemente de una conformación de unión preliminar a la unión al sitio luminal.

En los resultados obtenidos, el mejor ajuste de los efectos del STD experimental para las distintas conformaciones de unión se obtuvo cuando se consideró la interacción de los ligandos al sitio de poro, lo que sugiere que las señales de los experimentos de RMN de los miméticos de paclitaxel unidos a microtúbulos surgen como consecuencia de la liberación del ligando de los microtúbulos. Este paso de liberación final cumple con los requisitos cinéticos

del TR-NOESY y STD, ya que éste debe ser lo suficientemente rápido como para permitir obtener la señal.

Así, de acuerdo a nuestros datos experimentales, los MSA se unen y se disocian a/de los microtúbulos siguiendo un mecanismo de dos pasos (Díaz et al., 2000). El primer evento de unión se asigna a la unión al sitio del poro externo (Buey et al., 2007), donde la cinética de disociación es rápida (Díaz et al., 2000). El segundo, el paso lento, sería la internalización hacia el sitio luminal. Posteriormente, en el proceso de disociación, dichos eventos se invierten: la primera es la etapa lenta, asignada al transporte del compuesto desde el sitio interno luminal al sitio externo, mientras que el segundo paso, rápido, corresponde a la liberación del ligando al medio. Este mecanismo implica que la etapa de liberación final de los MSA de los microtúbulos tenga lugar desde el poro. Alternativamente, los dos pasos implicados en la unión podrían ser debidos a un cambio conformacional del sitio luminal, que resultaría en la liberación del ligando por difusión al medio por los extremos de los microtúbulos. Sin embargo, es de esperar que este proceso de difusión sea bastante lento (Evangelio et al., 1998; Odde, 1998) y, por lo tanto, no compatible con la liberación rápida observada previamente en presencia de paclitaxel radioactivo y docetaxel (2 min) (Díaz et al., 1998).

Los resultados presentados en este trabajo han permitido detectar, además, la interacción de la discodermolida al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina.

Como se ha comentado anteriormente, dicha interacción se ha caracterizado bioquímicamente, clarificando la manera en que los agentes estabilizantes de microtúbulos en estudio inducen el ensamblaje de los microtúbulos como consecuencia de la unión al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina. Estos datos muestran que dichos MSA juegan un doble papel, ya que no sólo estabilizan los microtúbulos ya formados, sino que también promueven la polimerización de la tubulina. Además, las conformaciones bioactivas y los epítomos de unión para discodermolida cuando se une a el heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina han podido determinarse por RMN. Por otra parte, se han descrito, también, los epítomos de unión del compuesto cuando se une a los microtúbulos, mediante los experimentos de STD. Los cálculos del perfil de

STD teórico (CORCEMA-ST) se llevaron a cabo teniendo en cuenta los dos posibles sitios de unión, localizados en el poro y en el lumen de los microtúbulos, para discriminar entre las diferentes conformaciones de unión. Los resultados de RMN observados pueden explicarse satisfactoriamente como consecuencia de la unión de este MSA en el poro de tipo I de los microtúbulos. La existencia de este modo de interacción sugiere por lo tanto que el proceso de reconocimiento de la discodermolida por los microtúbulos se lleva a cabo siguiendo el mecanismo de dos pasos discutido anteriormente. En primer lugar, se produce la unión al poro y, a continuación, la internalización en el sitio del lumen de los microtúbulos.

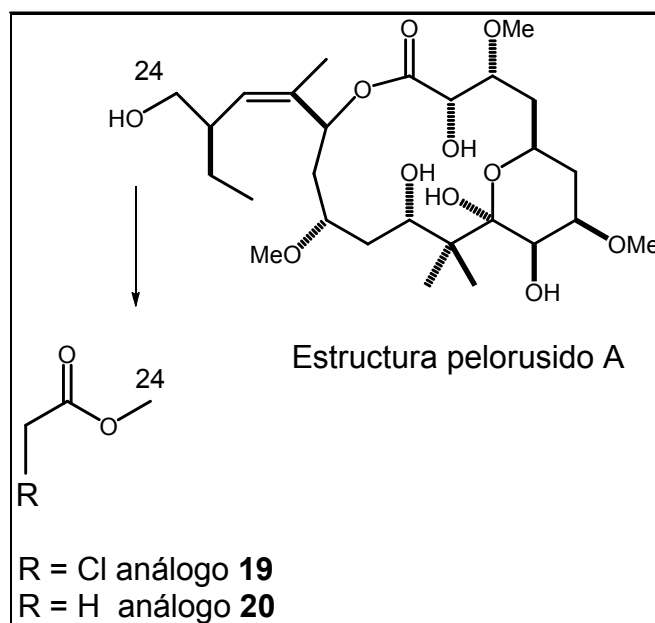
La comparación entre los perfiles teóricos de STD y los experimentales de la unión de la discodermolida al dímero de tubulina indican que la unión de los MSA al heterodímero de  $\alpha,\beta$  tubulina implica principalmente la región donde está localizado el sitio luminal en los microtúbulos. Por lo tanto, en las etapas iniciales del proceso, y cuando aún no se ha formado el polímero, los miméticos del paclitaxel interactúan principalmente en los sitios de unión luminal a nivel de  $\beta 1$ .

## 2. Familia de pelorusido A.

### 2.1. La modificación del alcohol primario localizado en la posición C24 no influye en la actividad celular de los compuestos ensayados.

Todas las premisas acerca del pelorusido A nos llevaron a determinar tanto la relación estructura-actividad del pelorusido, como su sitio de unión en los microtúbulos.

Desde un punto de vista químico, el alcohol primario localizado en la posición C24 de la estructura del pelorusido A se presentaba como el más simple de modificar. Por este motivo, se decidió determinar la implicación de dicha posición (introduciendo un grupo acetoxi o cloroacetoxi, figura 74) en la unión de la molécula a su sitio, con el fin de utilizarla como punto de anclaje de un grupo fluorescente, reactivo o radioactivo que permitiese también el uso de dicho análogo como sonda.



**Figura 74.** Modificaciones en la posición C24 de la estructura química de los análogos de pelorusido A estudiados.

En primer lugar se comprobó si las modificaciones realizadas en esta posición C24 podían influir en la actividad celular de los compuestos investigados.

Los ensayos celulares llevados a cabo pusieron de manifiesto resultados similares a aquéllos obtenidos en presencia de los agentes estabilizantes de microtúbulos que se unen al sitio del paclitaxel con una alta afinidad (Buey et al., 2005). Dichos ensayos mostraron que todos los compuestos estudiados eran citotóxicos y, además, capaces de vencer el fenotipo de resistencia de las células que sobreexpresan la gp-P.

La elucidación de su diana se realizó mediante un amplio estudio sobre los microtúbulos de la interfase, los husos mitóticos y la morfología nuclear; en el cual se confirmó que la actividad de los ligandos sobre el citoesqueleto de microtúbulos tenía lugar de manera similar a aquélla previamente observada en presencia del primer agente estabilizante de microtúbulos descubierto, el paclitaxel (Buey et al., 2005).

También se corroboró el efecto de los compuestos analizados sobre el ciclo celular, deteniendo de igual modo a las células tratadas en aquella fase del ciclo en la cual la célula ya tiene duplicado su material genético, sigue con su crecimiento sintetizando proteínas y ARN, e inicia la profase condensando el ADN (Alberts et al., 1994).

Como consecuencia, los resultados celulares definieron inequívocamente a esta serie de compuestos estudiados como agentes antimitóticos y estabilizantes de microtúbulos; siendo la tubulina, por tanto, su diana biológica.

Además, a la luz de estos primeros datos, y en las condiciones experimentales ensayadas, pudo observarse que las modificaciones en la posición C24 de la estructura del pelorusido A no influían en la actividad celular de los compuestos bajo análisis.

## **2.2. La sustitución del alcohol primario en la posición C24 impide la unión a microtúbulos (estabilizados y nativos) y la inducción del ensamblaje de tubulina pura.**

Con el fin de comprobar si las modificaciones en la posición C24 de los análogos de pelorusido A perturbaban la unión de dichos compuestos a los microtúbulos, así como el ensamblaje de la tubulina nativa, se llevaron a cabo ensayos de índole bioquímica.

Los resultados obtenidos establecieron que el pelorusido A se une a los microtúbulos de la misma manera que los agentes estabilizantes que interaccionan con el sitio de paclitaxel. La fijación de los microtúbulos preservó tanto el sitio del paclitaxel como el del pelorusido, permitiendo, por tanto, utilizar los microtúbulos estabilizados para estudiar la unión del ligando en examen a su sitio (Díaz et al., 2003). Como consecuencia, se pudo determinar la estequiometría de unión del pelorusido a los microtúbulos estabilizados.

Se determinó también la estequiometría de unión del pelorusido a microtúbulos nativos bajo condiciones en las cuales se previene el ensamblaje de tubulina (en ausencia de glicerol). El compuesto determinó dicho ensamblaje con una estequiometría de unión de  $1.04 \pm 0.08$  moléculas de compuesto por dímero de tubulina. En ausencia del ligando, la tubulina no sedimentó y sólo una molécula de pelorusido se unió para ensamblar la proteína, de un modo similar a lo descrito previamente en presencia de paclitaxel (Díaz et al., 1993).

Sorprendentemente, al contrario de lo que podíamos pensar a tenor de lo observado con células, dichos resultados pusieron de manifiesto que ninguno de los dos análogos esterificados investigados se une a microtúbulos estabilizados ni a microtúbulos nativos. En este caso, el alcohol primario en la posición C24 sí resultó esencial para la actividad del compuesto.

Desde un punto de vista termodinámico, el pelorusido A se une a los microtúbulos con baja afinidad ( $K_b$  35 °C  $2.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), significativamente más débil de la mayor parte de los ligandos cuya diana es el sitio del paclitaxel; y comparable a aquella de la sarcodictina A ( $K_b$  35 °C  $1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), identificada como molécula de baja afinidad años atrás (Buey et al., 2005).



Los parámetros termodinámicos obtenidos de la unión de pelorusido A resultaron ser moderadamente favorables en términos entálpicos ( $\Delta H = -19 \pm 4$  kJ mol<sup>-1</sup>) y entrópicos ( $\Delta S = 61 \pm 14$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) de la energía libre de unión, y similares a aquéllos determinados para sarcodictina A ( $\Delta H = -24 \pm 3$  kJ mol<sup>-1</sup> y  $\Delta S = 43 \pm 9$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>). A pesar de estos datos, el pelorusido resultó ser más activo en la inducción del ensamblaje de tubulina-GTP (en tampón PEDTA4-1 mM GTP) que la sarcodictina, que es incapaz de inducir dicho ensamblaje en las mismas condiciones experimentales, como se demostró en estudios previos (Buey et al., 2005). El ligando en examen puede, de este modo, ser comparado con los ligandos más potentes en lo que a la inducción del ensamblaje de tubulina se refiere, tales como el paclitaxel y el docetaxel, aunque con una afinidad de unión hasta diez veces inferior que éstos.

Ninguno de los dos análogos de pelorusido A analizados se une a los microtúbulos, confirmando la importancia del grupo funcional modificado.

### **2.3. El sitio de unión en los microtúbulos se localiza en la subunidad $\beta$ de la tubulina.**

A pesar de las similitudes observadas entre pelorusido y paclitaxel, estudios de competición entre dichos ligandos, así como entre laulimalida y paclitaxel, demostraron que el pelorusido y la laulimalida ocupan un sitio diferente del sitio del paclitaxel en los microtúbulos (Buey et al., 2005).

Trabajos previos proponen dos diferentes sitios de unión para pelorusido A en los microtúbulos, basados ya sea en el docking de la conformación bioactiva de dicho compuesto (Jiménez-Barbero et al., 2006) o en estudios de MSPM (*mass shift perturbation mapping*) (Percy et al., 2009; Khrapunovich-Baine et al., 2011; Huzil et al., 2008). El primer estudio sugiere que la localización del sitio de unión del pelorusido A se encuentra en la subunidad  $\alpha$  de la tubulina, bajo el loop B9-B10, en una ubicación equivalente a aquélla del sitio luminal de paclitaxel en la subunidad  $\beta$  de la proteína (Nogales et al., 1999). El segundo trabajo plantea dicha localización en la subunidad  $\beta$  de la tubulina, cerca del sitio del poro de tipo II en los microtúbulos. Ambos modelos

se discuten a la luz de los resultados experimentales mostrados en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos acerca de la relación estructura-actividad indicaron que el alcohol primario en la posición C24 es esencial para la unión a tubulina; puesto que tanto el análogo **11** como el **12** se mostraron incapaces de unirse a los microtúbulos o de inducir el ensamblaje de estos polímeros *in vitro*, tal y como se ha discutido anteriormente. Aunque los ligandos analizados presentaron capacidad citotóxica en las células tumorales ensayadas, en ese estudio también se mostró que dicha actividad surge como consecuencia de la hidrólisis del enlace éster en los medios de cultivo de las células. Este fenómeno, que ya se había previamente observado en nuestro laboratorio con el compuesto 2-acetil-flutax (Jiménez-Barbero et al., 1998), permite la actividad de los análogos estudiados a nivel celular, e impide, por el contrario, su efecto en microtúbulos *in vitro*.

El efecto de la acetilación del alcohol primario en la posición C24 ha sido explorado empleando técnicas de modelado molecular. Como resultado de estudios de *docking* previos, que indicaron que los ligandos del sitio del pelorusido se unen a la subunidad  $\alpha$  de la tubulina (Pineda et al., 2004; Jiménez-Barbero et al., 2006), la introducción de los grupos acetoxi o cloroacetoxi en la posición C24 parece perturbar negativamente dicha unión.

En otro abordaje experimental de la unión del pelorusido a microtúbulos, los experimentos de difracción de rayos X a bajo ángulo (SAXS) indicaron que dicha unión disminuye el ángulo entre los protofilamentos de los microtúbulos de manera más potente que la observada en presencia del paclitaxel. La presencia del pelorusido A reduce el número medio de protofilamentos, indicando, por tanto, una influencia estructural similar.

Como se ha comentado anteriormente, en el apartado de Introducción, los microtúbulos son cilindros huecos compuestos de protofilamentos igualmente espaciados, con un número medio de 13 protofilamentos (Alberts et al., 1994). Sin embargo, ésta representa una propiedad relativamente flexible del ensamblaje de la tubulina. Las transiciones en el número de los protofilamentos, de hecho, habían sido observadas en microtúbulos

ensamblados espontáneamente *in vitro* (Chrétien et al., 1992); y en microtúbulos preensamblados, el número de protofilamentos puede cambiar rápidamente en respuesta a la unión de un ligando (Díaz et al., 1998). Los cambios en este número implican necesariamente que se altere el ángulo de interacción entre dichos protofilamentos, reduciendo el número si el ángulo es más estrecho y aumentándole si el ángulo es más amplio. Aunque, en principio, la reducción observada indicó una estabilización de microtúbulos similar a aquella determinada por el paclitaxel, este hecho pareció ser incompatible con el mecanismo de estabilización propuesto por Huzil y sus colaboradores para el pelorusido A (Huzil et al., 2008). El mecanismo de acción que estos autores sugieren para dicho compuesto implica la interfaz interdimérica, e incluye contribuciones de la interfaz intradimérica de  $\alpha,\beta$ -tubulina y de los contactos entre los mismos protofilamentos. Sin embargo, dado que el sitio de unión propuesto en  $\beta$ -tubulina está próximo al sitio del poro de tipo II y al espacio entre protofilamentos, la unión del pelorusido a este sitio (propuesto por el grupo de Huzil) parece ser consistente con la reducción obtenida en el presente trabajo en el número de los protofilamentos en presencia del compuesto estudiado.

Finalmente, los epítomos de unión del pelorusido A a los microtúbulos, determinados mediante los experimentos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear, indicaron que los protones H8, H17, OMe-3, OMe-13, M-20 y Me-22 deberían estar involucrados fuertemente en la interacción con dichos polímeros. Cuando se compararon los valores de saturación de los protones con el grado de exposición en ambos modelos de unión (Tabla 33), se especuló, en un primer momento, que la unión al sitio en la subunidad  $\alpha$  de la tubulina pareció estar favorecida, puesto que todos los protones con valores de saturación altos o medios apuntaron dentro del sitio de unión propuesto o estaban en estrecho contacto con la proteína.

Número de protones	Saturación (%)	Sitio en la subunidad $\alpha$	Sitio en la subunidad $\beta$
H7	11	I	I
H8	20	I	E
H14	10-12	I	E
H15	14	E	E
H17	18	S	E
H19a	12	S	E
Me-20	17	S	E
Me-21	13	I	E
Me-22	16	I	E
Me-23	17	S	I
OMe-3	24	I	S
OMe-7	28	I	E
OMe-13	14	I	E

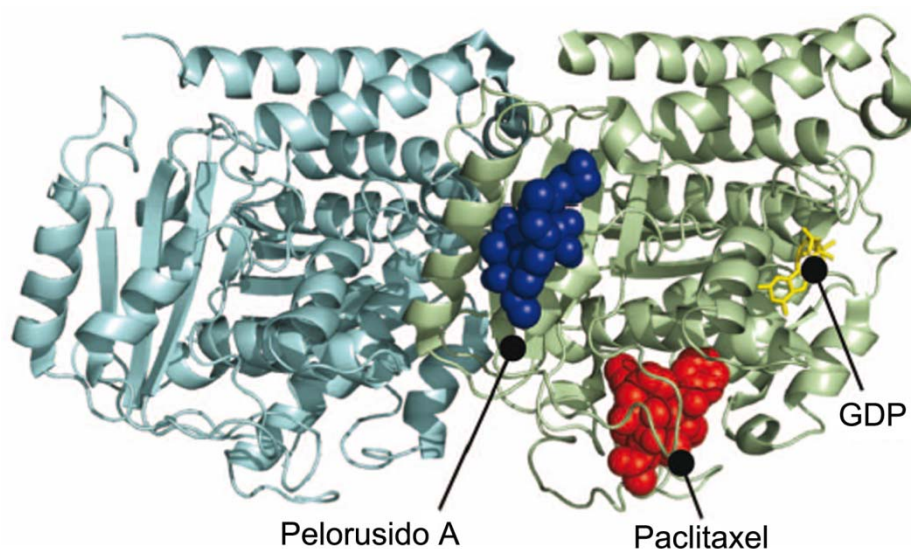
**Tabla 33.** STD de los protones del pelorusido A en comparación con los epitopos de unión predichos de los dos sitios de unión propuestos: sitio de la subunidad  $\alpha$  (Pineda et al., 2004; Jiménez-Barbero et al., 2006); sitio de la subunidad  $\beta$  (Huzil et al., 2008) de tubulina. I = protones en el sitio de unión; E = protones expuestos al solvente; S = protones en estrecho contacto con la proteína.

Por tanto, a tenor de los datos obtenidos, el sitio de unión propuesto pareció ser favorecido en la subunidad  $\alpha$  de la tubulina. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la evidencia experimental previamente proporcionada por el grupo de Huzil apoyaba como posible sitio de unión aquél situado en la subunidad  $\beta$  (cerca del sitio del poro de tipo II, que influiría más fácilmente en el diámetro de los microtúbulos). Además, dicho grupo de investigación mostró que el sitio de unión en  $\alpha$ -tubulina (dentro de la región 373-383) estaba protegido del intercambio hidrógeno-deuterio después de la unión del pelorusido (Huzil et al., 2008).

A la luz de estos datos, se especuló que la unión del compuesto en examen implicase un mecanismo de dos pasos equivalente a aquél propuesto

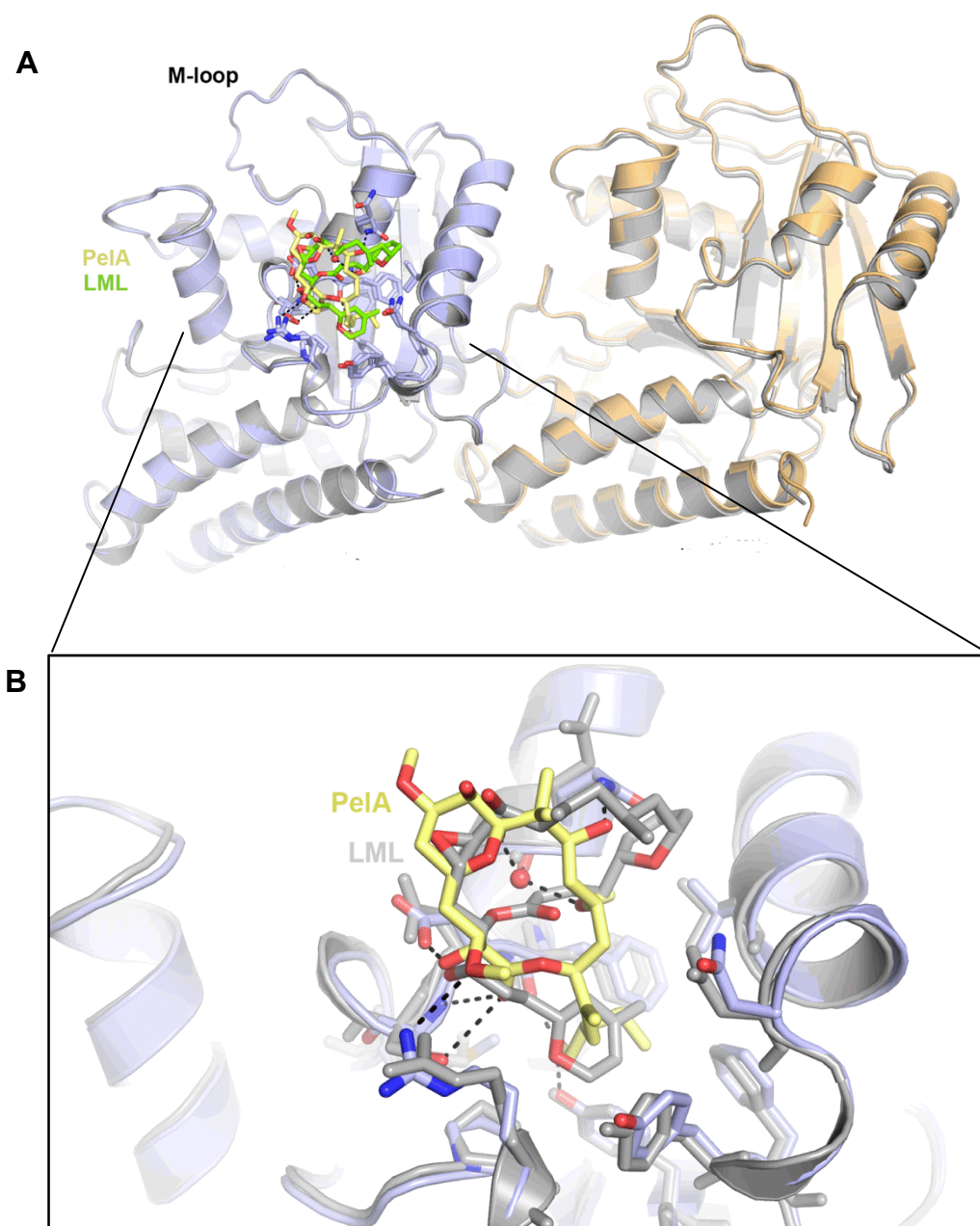
para los taxanos (Buey et al., 2007; Díaz et al., 2003). Este mecanismo implicaría una unión inicial, que podría ser en el sitio del poro en  $\beta$ -tubulina; y el subsiguiente transporte de ligando en el sitio interno en la subunidad  $\alpha$  de la proteína.

Estudios más recientes (Nguyen et al., 2010; Begaye et al., 2011; Kanakkanthara et al., 2011) sugieren mediante datos de mutantes resistentes a pelorusido A que la localización del sitio de unión de pelorusido A en los microtúbulos se encuentra en la subunidad  $\beta$  de la tubulina (Figura 75).



**Figura 75.** Sitio de unión de pelorusido A en la subunidad  $\beta$  de la tubulina. Visión global del sitio de unión del pelorusido A (azul) en la subunidad  $\beta$  de la tubulina en relación con el sitio de unión del paclitaxel (rojo) en la subunidad  $\beta$  de la tubulina. La subunidad  $\alpha$  se representa en azul claro, la  $\beta$  en verde pálido y el GDP en amarillo. (Modificado de Begaye et al., 2011).

Este hecho ha sido comprobado mediante resultados cristalográficos preliminares, obtenidos por nuestro grupo en colaboración con el del Dr. Steinmetz (datos no publicados, figura 76).



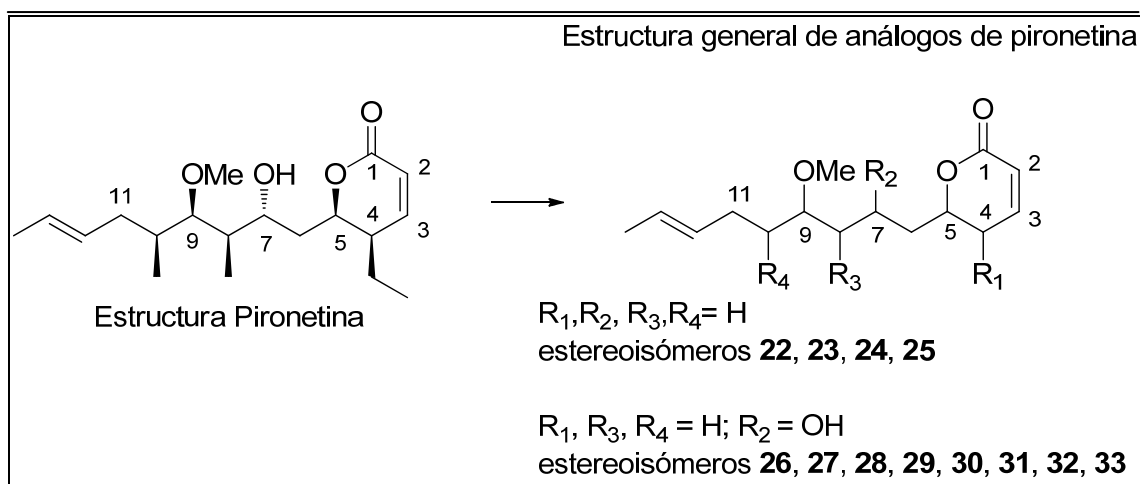
**Figura 76.** Cristalografía del sitio de unión del pelorusido a la subunidad  $\beta$  de la tubulina. **A:** Diagrama de cintas del sitio de unión del pelorusido en la subunidad  $\beta$  de la tubulina. La subunidad  $\alpha$  se representa en naranja, la  $\beta$  en gris, el pelorusido A en amarillo y la laulimalida en verde. **B:** Detalle de la unión de pelorusido A (amarillo) en la subunidad  $\beta$  (gris) de la tubulina. La laulimalida se representa en gris claro.

### 3. Familia de pironetina.

#### 3.1. Los análogos simplificados de la pironetina conservan una proporción medible de la actividad citotóxica del producto natural y, como éste, se clasifican como agentes desestabilizantes de microtúbulos.

La pironetina es un potente inhibidor del ensamblaje de tubulina que detiene la progresión del ciclo celular en la fase G<sub>2</sub>/M (Kondoh et al., 1998; Kondoh et al., 1999). Estudios previos de relación estructura-actividad sugieren que dicho compuesto se une covalentemente a la tubulina, localizándose el sitio de unión del ligando en la zona que corresponde al sitio de unión de la vinblastina (un alcaloide de la vinca). Así, la pironetina inhibe la unión de la vinblastina a la tubulina, y la afinidad a dicha proteína es más fuerte que la de la misma vinblastina (Usui et al., 2004). La estructura de la pironetina está constituida únicamente por un residuo pirano y una cadena alquílica, de modo que dicho compuesto puede ser considerado como el más simple entre los agentes antimitóticos conocidos. La investigación de nuevos miembros análogos de la pironetina constituye, de este modo, un objetivo importante en la química y la farmacología de los tumores.

El propósito de nuestro estudio fue la preparación de productos con una estructura más sencilla que la pironetina, pero que pudieran mostrar las mismas características del compuesto parental (Figura 77). En realidad, la pironetina no es una molécula extremadamente compleja. Sin embargo, con sus seis estereocentros *sp*<sup>3</sup>, su síntesis total es, en cualquier caso, suficientemente larga como para no considerar demasiado práctica su preparación en gran escala.



**Figura 77.** Modificaciones en la estructura química de los análogos de pironetina estudiados.

En el presente trabajo, los ensayos celulares que se realizaron para evaluar si las simplificaciones estructurales de la molécula de pironetina alteraban la actividad biológica de los análogos sintetizados mostraron que dichos compuestos simplificados eran citotóxicos. Los ligandos investigados evidenciaron parte de la citotoxicidad observada en presencia del producto natural, a pesar de las simplificaciones introducidas en la estructura de la molécula parental. Los compuestos estudiados presentaron efectos citotóxicos en las líneas celulares humanas de carcinoma de ovario empleadas (sensibles y multirresistentes a fármacos por sobreexpresión de la glicoproteína-P) y, aunque con citotoxicidades mucho más bajas, todos los productos de síntesis pusieron de manifiesto una actividad en la misma línea que el ligando de referencia, como se había previamente demostrado para compuestos con un mecanismo de acción covalente, como ciclostreptina (Buey et al., 2007).

En los ensayos de inmunofluorescencia, se observó disminución o, dependiendo de la concentración y del compuesto empleado, ausencia de la red microtubular en las células humanas de carcinoma de pulmón. Los análogos en examen tenían efectos a concentraciones más altas que la pironetina, provocando, al igual que dicha molécula de referencia, una total despolimerización de los microtúbulos. Ligandos cuyas estructuras presentan el hidroxilo en posición C7 (análogos **22-25**) exhibieron mejores resultados al compararse con la mayoría de los análogos que carecen de este grupo en esta



misma posición. En cualquier caso, los compuestos en estudio resultaron ser activos a nivel del citoesqueleto y, como consecuencia de todos los resultados obtenidos, se clasificaron como agentes desestabilizantes de microtúbulos.

El estudio del efecto de los compuestos sobre el ciclo celular de células tratadas evidenció que estos ligandos detienen el proceso de división celular en la fase G<sub>2</sub>/M, de la misma manera que la pironetina y, en general, en la condición común de los agentes moduladores de microtúbulos. Dicho efecto, en este caso, se reveló mucho más pronunciado para los análogos cuyas estructuras presentan el grupo hidroxilo en posición C7 (análogos **26-33**). Sin embargo, a mayores concentraciones el efecto resultante fue bastante citotóxico.

Por tanto, a la luz de estos primeros datos, y siempre en base a las condiciones experimentales ensayadas, se pudo decir que los compuestos estudiados impiden el ensamblaje de microtúbulos tanto en células interfásicas como en células mitóticas tratadas; alterando, de este modo, funciones celulares entre las que cabe destacar la formación de husos mitóticos aberrantes, hecho que a la larga conduce a la célula a un proceso de muerte celular programada.

En conclusión, los estudios celulares iniciales de la caracterización de los análogos sintéticos de la pironetina, revelan que estos productos mantienen la misma capacidad antimitótica y despolimerizante de microtúbulos de la molécula madre. Sin embargo, la simplificación estructural de los análogos de pironetina resultó excesiva para mantener la elevada actividad de la molécula parental.

### **3.2. Los productos de síntesis de la familia de la pironetina alteran el estado de agregación de la tubulina impidiendo la formación de los microtúbulos.**

Con el fin de seguir evaluando si las simplificaciones en la estructura de la pironetina influían en la actividad de los productos obtenidos, realizamos estudios bioquímicos de interacción de estas moléculas de síntesis con los microtúbulos *in vitro*.

Los ensayos bioquímicos pusieron de manifiesto que los análogos en examen comparten el mismo mecanismo de acción que la pironetina y compiten con dicho ligando por el mismo sitio de unión en los microtubulos. Por una parte, los ensayos de modulación del ensamblaje de tubulina pura por ligando evidenciaron la capacidad desestabilizadora de microtúbulos, *in vitro*, de la serie de compuestos estudiada, puesto que incrementan el valor de la concentración crítica de la tubulina (Cr) del mismo modo a como lo hacen la pironetina y los otros agentes desestabilizadores de microtúbulos conocidos (Medrano et al., 1989). De la misma forma, ensayos de competición entre los ligandos investigados y la pironetina mostraron que dichos compuestos desplazan a la molécula de referencia de su sitio en la tubulina. Se puede confirmar, entonces, que estos análogos de pironetina se unen al mismo sitio que ésta en la subunidad  $\alpha$  de dicha proteína, como ya se ha descrito anteriormente.

Por tanto, los resultados obtenidos confirman que la actividad de los agentes estudiados observada en células, aunque más débil que la de la pironetina, puede atribuirse a la interacción de dichos análogos con la tubulina. Concentraciones de análogos (más altas que aquéllas empleadas para la pironetina) similares a aquéllas requeridas para mostrar efecto en las células tumorales utilizadas en nuestro experimentos resultan en un aumento de la concentración crítica de tubulina necesaria para el ensamblaje. Esta circunstancia indica, por tanto, que la misma tubulina representa, en realidad, la diana celular de los análogos simplificados estudiados y que las simplificaciones en la estructura parental no extinguen la actividad de las moléculas estudiadas, aunque sí disminuyen en su potencia.

### **3.3. La eliminación del grupo hidroxilo en la posición C7 no influye en la actividad de los análogos estereoisoméricos.**

El análisis de los diversos datos biológicos y bioquímicos obtenidos, así como el estudio de la relación estructura-actividad de los compuestos simplificados, muestran que las configuraciones de los estereocentros no parecen ejercer una influencia relevante en la citotoxicidad, en la capacidad de los compuestos de

unirse a la tubulina y en el mecanismo de acción. Los análogos estereoisoméricos, de hecho, exhiben los mismos efectos que el compuesto natural, mostrando dichos efectos a concentraciones del mismo orden de magnitud entre ellos, pero más altas que aquélla correspondiente a la pironetina.

En contraste con lo demostrado previamente en presencia de pironetina, donde se observó que era importante la presencia del grupo hidroxilo en la posición C7 (Kondoh et al., 1998; Kondoh et al., 1999), la eliminación de este grupo hidroxilo (análogos **22-25**) no provoca una supresión de la citotoxicidad o de la capacidad de despolimerizar los microtúbulos. Sin embargo, dichos compuestos son menos eficaces en la acumulación de las células en mitosis si se comparan con aquéllos que presentan dicho grupo hidroxilo en C7 (análogos **26-33**).

En suma, todas estas evidencias deberían tenerse en cuenta en la planificación y diseño de nuevas estructuras en la próxima generación de análogos de pironetina.

#### **4. Familia de podofilotoxina.**

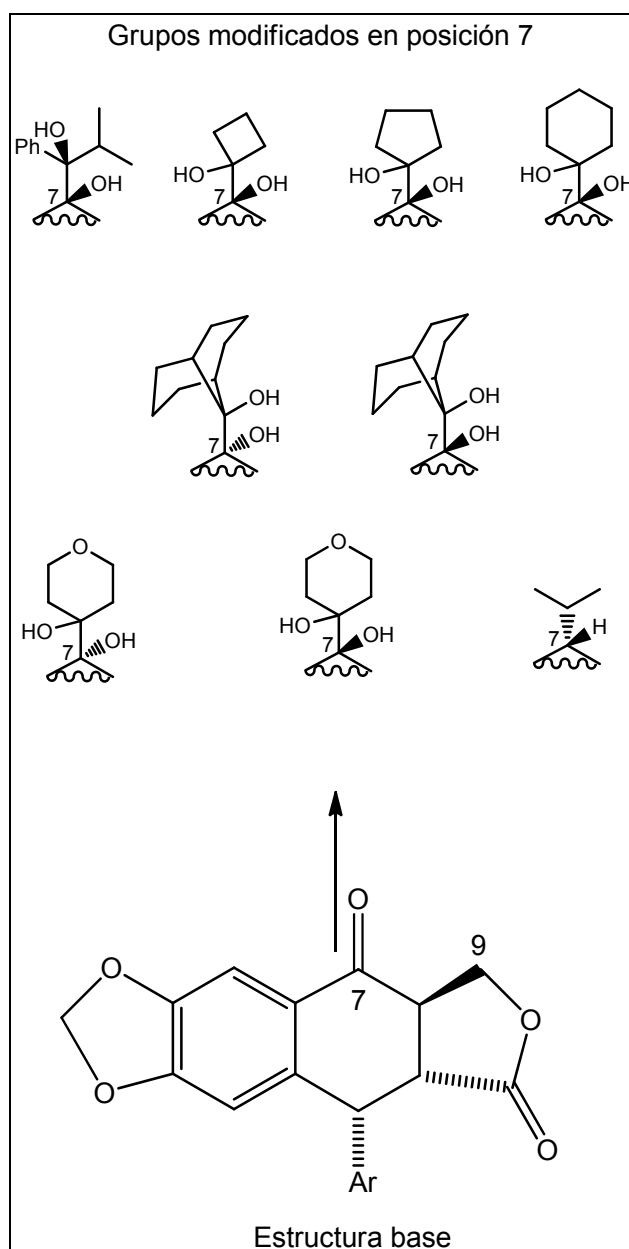
**4.1. Los epímeros 7 $\beta$ -OH son significativamente más potentes que sus correspondientes análogos 7 $\alpha$ -OH.**

**La ausencia del grupo hidroxilo en la posición C7 no influye en la actividad del compuesto en las células ensayadas.**

La podofilotoxina es un compuesto que inhibe la polimerización de tubulina mediante la unión al sitio de colchicina en los microtúbulos. Sin embargo, trabajos previos sugieren que unos derivados sintéticos de la molécula de podofilotoxina presentan un mecanismo de acción distinto de esta última, provocando la inhibición de la topoisomerasa II del ADN (Jordan et al., 1998; Hande, 1998; Meresse et al., 2004; You, 2005). Incluso estudios más recientes muestran una prueba experimental de la existencia de un tercer mecanismo posible para ciertos ligandos derivados de podofilotoxina, los cuales provocarían inducción de apoptosis en las células tumorales sin la necesidad de inhibir anteriormente la tubulina (Castro et al., 2010). Desafortunadamente, a pesar de los intensos esfuerzos centrados en la obtención de derivados o análogos mejorados del producto natural, hasta ahora no se ha encontrado ninguna molécula que pueda superar la eficacia de dicho producto en la inhibición del ensamblaje de los microtúbulos (Mukherjee et al., 2001). Además, todos los compuestos relacionados con podofilotoxina conservan los efectos desfavorables típicos de la molécula parental, y comunes al conjunto de agentes antineoplásicos, tales como la depresión medular, anemia, pérdida de cabello y graves trastornos gastrointestinales, en estrecha relación con la potencia de sus respectivas citotoxicidades.

Con estas premisas, y evaluando las investigaciones previas de relación estructura-actividad de los derivados de podofilotoxina conocidos hasta el momento (Gupta et al., 2006; Kim do et al., 2006; Xiao et al., 2004), se sintetizaron para el presente estudio nuevos análogos, considerando como región preferente para la modificación estructural la posición C7 del compuesto original (Xiao et al., 2002). Con el objetivo de añadir fragmentos adicionales que incrementasen la afinidad del compuesto al sitio de colchicina y la

selectividad de la interacción de dichos ligandos con los microtúbulos, reduciendo la toxicidad y los efectos adversos mencionados anteriormente de los derivados de podofilotoxina, se diseñaron productos con dos configuraciones diferentes ( $7\alpha$ -OH, como podofilotoxina, y  $7\beta$ -OH, como epipodofilotoxina) y con distintas cadenas en posición C7 (Figura 79).



**Figura 79.** Estructura base y modificaciones en posición 7 en la estructura química de los análogos de podofilotoxina. Ar: 3,4,5 trimetoxifenilo.

Los experimentos celulares llevados a cabo pusieron de manifiesto que todos los compuestos estudiados eran citotóxicos. En relación a la citotoxicidad antitumoral de los ligandos investigados, los epímeros  $7\beta$ -OH fueron significativamente más potentes que sus correspondientes análogos  $7\alpha$ -OH. Dicho resultado podría indicar que tanto la dimensión como la orientación del sustituyente en la posición C7 deben ser más importantes para la actividad del compuesto que la naturaleza o el tipo de grupo funcional localizado en dicha posición. Esta consideración se vería reforzada por los resultados de citotoxicidad obtenidos en presencia del compuesto **41** ( $7\alpha$ -isopropildeohipodofilotoxina, el ligando más potente junto con el análogo **39 $\beta$** ), cuya estructura no presenta ningún hidroxilo o grupo funcional en la cadena lateral en posición C7.

Los ensayos de inmunofluorescencias directa, realizados en presencia de la línea celular humana de carcinoma de pulmón A549, mostraron que los productos objeto de estudio determinan una completa despolimerización de los microtúbulos en las células ensayadas; identificándose, por tanto, como agentes desestabilizantes de microtúbulos al igual que la podofilotoxina. En este caso, de la misma manera que en los ensayos anteriores, el efecto de los compuestos de la serie  $\beta$  resultó ser más potente que los observados en los productos de la serie  $\alpha$ , confirmando que las modificaciones de esta serie de moléculas son más favorables para la actividad de los compuestos.

La capacidad antimitótica de los productos de síntesis se confirmó como consecuencia de los ensayos llevados a cabo para el estudio del efecto de dichos derivados sobre el ciclo celular. Los compuestos con una configuración  $7\beta$ -hidroxil/ $7\alpha$ -(1-hidrossialquil) fueron bastante más eficaces que sus correspondiente epímeros, y los compuestos más activos, **41** y **39 $\beta$** , indujeron un bloqueo de las células en mitosis a concentraciones de un orden de magnitud más bajo que el del producto de referencia. Dichos resultados demostraron, una vez más, que los productos de la serie de epipodofilotoxina resultan ser más activos que aquéllos de la serie de podofilotoxina, y que la ausencia del grupo hidroxilo en la posición C7, en el análogo **41**, no es esencial

para mantener la misma actividad mostrada en presencia de la podofilotoxina en las células ensayadas.

#### **4.2. Las modificaciones realizadas en los compuestos objeto de estudio conservan o incluso mejoran las propiedades desestabilizantes de la podofilotoxina.**

Con el fin de confirmar la naturaleza de los derivados de podofilotoxina se realizaron ensayos de modulación del ensamblaje de tubulina *in vitro*.

Los resultados de dichos ensayos de modulación del ensamblaje de tubulina pura por los ligandos en examen se correlacionaron muy bien con aquéllos obtenidos en células descritos anteriormente. Los resultados de los ensayos de polimerización de tubulina mostraron que la mayoría de los productos de síntesis investigados son potentes inhibidores del ensamblaje de tubulina, presentando, en algunos casos, efectos más potentes que la misma podofilotoxina. Los epímeros de la serie  $\beta$ , en particular el compuesto **39 $\beta$** , se confirmaron como los mejores agentes desestabilizantes de microtúbulos entre los agentes testados de la familia bajo análisis. En la misma línea, en presencia del análogo **41** se obtuvo la mejor inhibición de dicha polimerización, confirmando lo observado en células. Es interesante observar que, como se ha comentado anteriormente, el compuesto **41** no tiene ningún grupo funcional en la cadena lateral unida a C7. Esta observación presenta una alternativa estructural inesperada en el diseño de nuevos y probablemente más potentes inhibidores de la polimerización de tubulina; opción también basada en la observación de la naturaleza más bien lipófila de la región no ocupada en el sitio activo, como se ha descrito en el apartado 4 de Resultados.

#### **4.3. El dímero de tubulina es la diana molecular de los compuestos estudiados, que se une al sitio de colchicina, con exclusión de los ligandos 39 $\alpha$ y 40 $\alpha$ .**

Los ensayos de competición realizados permitieron confirmar el mecanismo de acción para los ligandos en examen, mostrando como éstos desplazan al

análogo de colchicina, MTC, de su sitio de unión en los microtubulos. De esta manera, se estableció como diana molecular para los productos de síntesis de la familia de podofilotoxina el sitio de la colchicina en los polímeros de tubulina. Se confirmó, además, que el ligando carente del grupo hidroxilo en posición C7 muestra la más alta afinidad para dicho sitio de unión. Dichos resultados se corroboraron, además, mediante los cálculos virtuales de *docking* para el análogo **41**.

Los experimentos de modelado molecular se realizaron en el laboratorio del Dr. San Feliciano, de la Universidad de Salamanca.

Se partió de un modelo de interacción entre tubulina y podofilotoxina descrito en un trabajo de investigación de unos años atrás (Álvarez et al., 2008) como resultado de cálculos sobre complejos cristalinos a su vez previamente publicados (Ravelli et al., 2004).

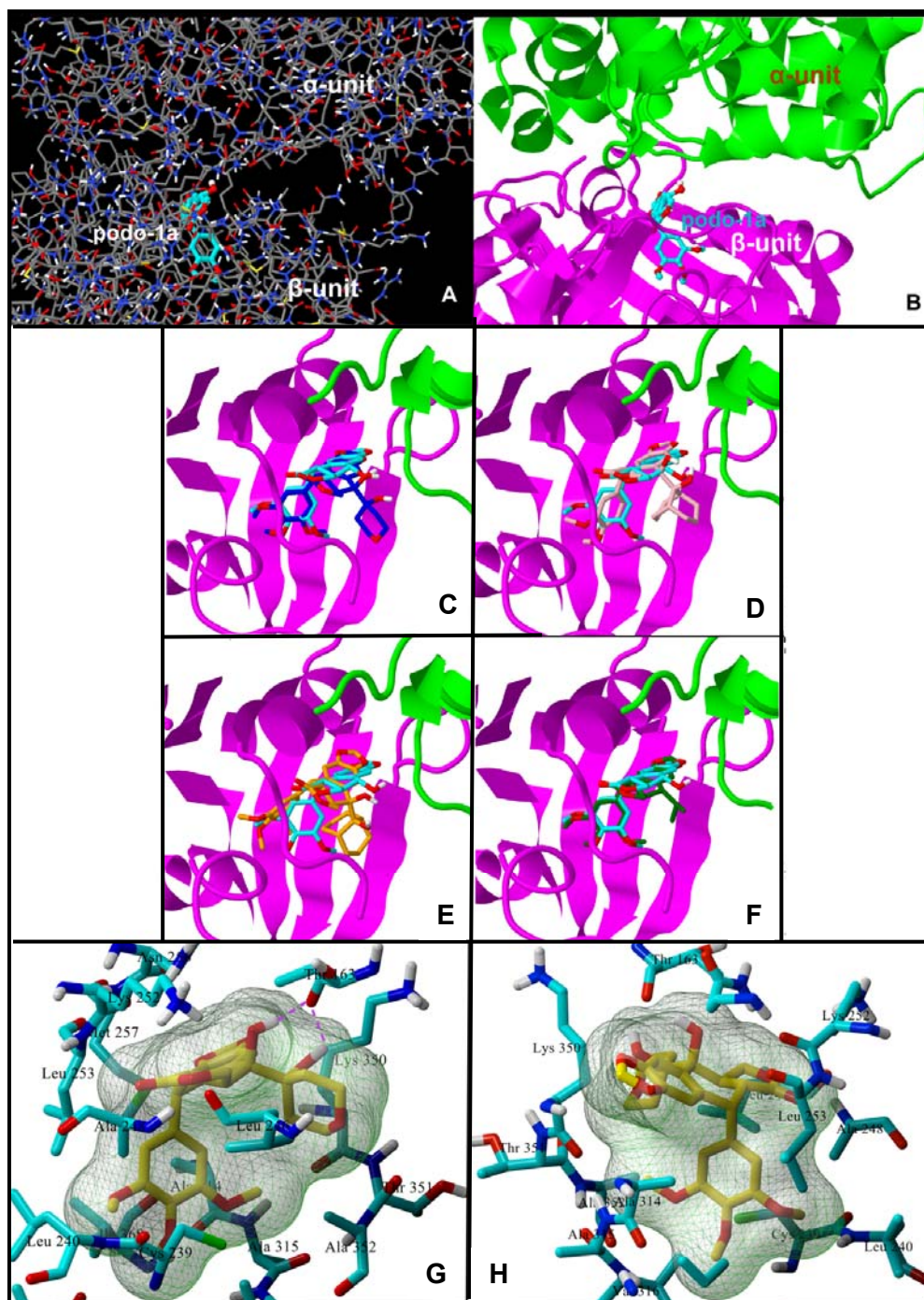
Con el fin de calcular la interacción de los derivados de la familia de podofilotoxina con tubulina mediante el programa AutoDock, los derivados fueron sometidos a una optimización del campo de fuerza conformacional MMFF implementada en Spartan 08 (Spartan 08; Hehre, 2003).

El *docking* de los derivados de la serie 7 $\beta$ -OH llevó a resultados energética y geoméricamente ajustados para todos los compuestos analizados, en particular en presencia de los ligandos más citotóxicos y más potentes en la inhibición de la polimerización de tubulina (**39 $\beta$** , **40 $\beta$**  y **41**) (Figura 80, D o E, C y F, respectivamente). Al contrario, un compuesto con un sustituyente grande o voluminoso en posición C7, como **40 $\alpha$**  (7 $\beta$ -tetrahidropiran-4-ilo), no pudo acoplarse al sitio de colchicina. El compuesto **39 $\beta$**  llevó a dos diferentes conformaciones de energía similar, una cerca y la otra rotada de 30° respecto a la orientación original del modelo de unión de la podofilotoxina (Figuras 80, D y E). Las figuras 80 G y H representan dos orientaciones del pirano **40 $\beta$**  identificando además los aminoácidos implicados en su interacción con la tubulina.

En la figura mostrada, se puede observar la naturaleza lipofílica de la región de la tubulina alrededor del fragmento trimetoxifenil (unidad  $\beta$  de



tubulina), así como las posibles interacciones mediante puentes de hidrógeno de la función pinacol con el grupo hidroxilo de la Thr163 (unidad  $\alpha$  de tubulina).



**Figura 80.** Modelo de unión de podofilotoxina a tubulina (**34a** en azul claro) representada en dos diferentes formas y orientaciones (**A**, **B**), con el fin de mostrar la probable ruta de acceso al sitio activo entre las unidades  $\alpha$  y  $\beta$  de tubulina, y comparación de **34a** con diferentes

inhibidores seleccionados de la polimerización, **40 $\beta$**  (**C**), **39 $\beta$**  (dos modelos permitidos de **39 $\beta$** , **D**, **E**) y **41** (**F**). También se muestran los residuos aminoácidos de la tubulina en la interacción con el inhibidor **40 $\beta$**  (**G**, **H**). Los puntos en rosa indican los puentes de H entre el compuesto y la Thr163 (**G**).

Los ensayos y los estudios centrados en el mecanismo de acción de los agentes de la familia de podofilotoxina demostraron un paralelismo total entre la citotoxicidad, la detención del ciclo celular y la inhibición de la polimerización de la tubulina; así como en el desplazamiento del MTC desde el sitio de unión de la colchicina en los microtúbulos por los compuestos ensayados.

A fin de facilitar una comparación más completa y resolutive de toda la metodología empleada, la tabla 34 muestra los valores de citotoxicidad celular, inhibición de la polimerización de tubulina y de la capacidad de acoplamiento en el sitio de unión en dicha proteína de algunos de los compuestos de este estudio. A modo de balance, tanto los datos experimentales como los calculados por *docking* parecen estar globalmente de acuerdo para la mayoría de los ligandos analizados, con algunas excepciones que podrían ser interpretadas teniendo en cuenta las influencias esperadas del tamaño del sustituyente en posición C7 y el grado de ocupación del sitio relativa a la correspondiente energía de acoplamiento.

La excepción más evidente, que merece un estudio adicional, corresponde a los datos mostrados para el compuesto **39 $\alpha$** , que presenta un valor de citotoxicidad por encima de 5  $\mu$ M y no se acopla en el sitio activo de unión; pero que sí que es capaz de inhibir la polimerización de tubulina y de desplazar el análogo MTC del sitio de unión de la colchicina en los microtúbulos.

Compuestos	IC50 (nM)	Inhibición de la polimerización de tubulina a [1 $\mu$ M] (%)	Desplazamiento de MTC (%)	Energía de docking (Kcal/mol)
<b>34a</b>	12	7	25	-9.2
<b>39<math>\alpha</math></b>	5680	12	15	nd
<b>39<math>\beta</math></b>	6.4	45.1	nd	-9.2
<b>40<math>\alpha</math></b>	8920	2.8	nd	nd
<b>40<math>\beta</math></b>	29	21.1	nd	-10.7
<b>41</b>	79.5	84.5	35	-10

**Tabla 34.** Datos experimentales y calculados para la mayoría de los ligandos analizados de la familia de podofilotoxina relativos a su actividad antimitótica.

## **5. Familia de amfidinolidas.**

### **5.1. La red de microfilamentos es la diana celular de los compuestos investigados.**

Los microtúbulos y los filamentos de actina juegan un papel crucial en distintas funciones celulares (Chen et al., 2000; Desai and Mitchison, 1997). Como se ha comentado anteriormente, se conocen distintos agentes moduladores de los microtúbulos que, exhibiendo gran diversidad estructural, han sido ampliamente caracterizados debido a su dilatado uso en la investigación básica y medicinal. De la misma manera, se han identificado moléculas naturales estructuralmente pequeñas, que inhiben la dinámica del citoesqueleto de actina, como valiosas sondas moleculares para diseccionar complejos mecanismos celulares que dependen de dicha proteína. Más recientemente, su uso potencial como medicamentos quimioterapéuticos se ha convertido en un foco de investigación científica importante (Spector et al., 1999; Giganti and Friederich, 2003; Fenteany and Zhu, 2003). De todas formas, aunque los agentes que interaccionan con los filamentos de actina representen un campo de exploración muy atractivo para los investigadores, queda, todavía, mucho por descubrir, y una investigación en esta dirección puede abrir nuevos horizontes en la lucha contra la patología del cáncer. Una limitación innegable para el uso de productos naturales como fármacos terapéuticos, dirigidos contra los microfilamentos, es su incapacidad para distinguir entre la actina de células normales y transformadas, haciendo dichos productos demasiado tóxicos para un uso clínico directo. Este inconveniente proporciona, sin embargo, un marco de trabajo para el diseño de nuevos compuestos sintéticos, con propiedades funcionales mejoradas, que puedan ser empleados tanto en la investigación como en los ensayos clínicos. Además, esta restricción no excluye la posibilidad de que el estudio de ligandos dirigidos contra la actina pueda proporcionar informaciones químicas fundamentales para inspirar la síntesis de agentes quimioterapéuticos más eficaces que controlen la proliferación de las células tumorales.

Existen distintos grupos de productos naturales, aislados a partir de una gran variedad de fuentes (plantas terrestres, esponjas, algas, hongos y

bacterias) que interaccionan y muestran citotoxicidad contra el citoesqueleto de actina de forma específica (Spector et al., 1999; Fenteany and Zhu, 2003; Yeung and Paterson, 2002). Sus características estructurales comunes incluyen principalmente un componente hidrofóbico y grupos laterales estereoquímicamente complejos. En general, estos compuestos se pueden dividir en dos grupos: agentes que inhiben el ensamblaje de actina o desestabilizan los microfilamentos (Tanaka et al., 2008), y ligandos que estabilizan dichos filamentos de actina (Uribe and Jay 2009; Levitsky et al., 2008).

Las amfidinolidas representan uno de los distintos grupos de compuestos citotóxicos investigados que interaccionan con la actina. Realmente, el mecanismo de acción de dicho grupo de ligandos estaba poco caracterizado hasta este momento, excepto para la amfidinolida H.

Dado el gran interés en individualizar nuevas moléculas con potenciales aplicaciones farmacológicas, nuestro trabajo se ha focalizado en la caracterización del mecanismo de acción, así como de la unión a su diana molecular, de la amfidinolida J, amfidinolida X (notable por su inusual estructura diólido no simétrica (Tsuda et al., 2003), que ha atraído la atención de varios grupos de síntesis (Fürstner et al., 2006; Lepage et al., 2004; Rodríguez-Esrich et al., 2007) desde su descubrimiento en 2003, y dos diólidos estructuralmente relacionados con este último ligando, entre la larga serie de macrólidos citotóxicos aislados del género *Amphidinium*.

Los ensayos celulares llevados a cabo para los compuestos de la familia de amfidinolidas mostraron que todos los ligandos investigados eran citotóxicos en las líneas celulares ensayadas, aunque el efecto resultó menos potente que el previamente determinado en las células L1210 y KB (Tsuda et al., 2003; Kobayashi et al., 1993; Kobayashi and Kubota, 2007).

Ninguno de los compuestos estudiados presentó efecto a nivel del citoesqueleto de microtúbulos ni de los filamentos intermedios; al contrario, se observaron alteraciones en la morfología y en las dimensiones de los microfilamentos. Como consecuencia de estos resultados, se pensó que estos compuestos podrían representar posibles agentes estabilizantes o

desestabilizantes de actina que, respectivamente, inhibirían la despolimerización de los filamentos de actina fortaleciendo la interacción entre los monómeros (como la amfinolida H, la faloidina o la jasplakinolida) (Uribe, 2009; Levitsky et al., 2008), o bien serían agentes que bloquearían la formación de F-actina (como las citocalasinas o latrunculinas) (Tanaka et al., 2008).

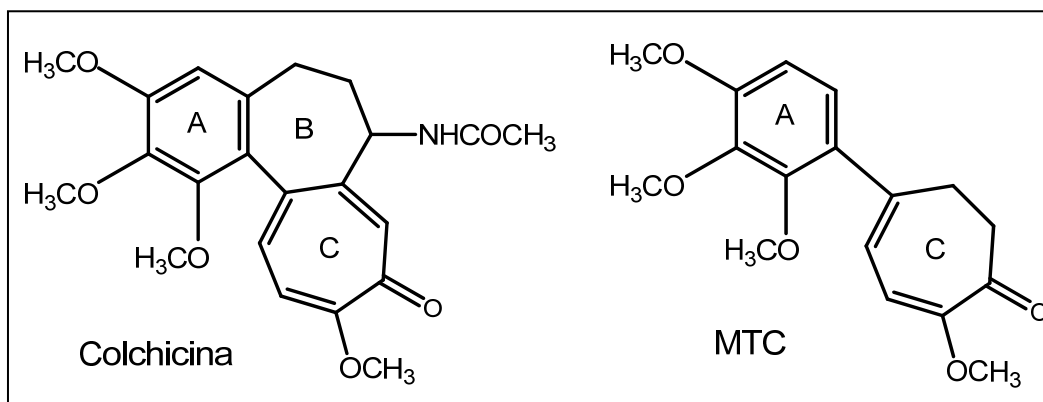
## **5.2. Los compuestos estudiados no interaccionan con los microtúbulos (estabilizados o nativos) y no se unen ni al sitio del paclitaxel ni al sitio de la colchicina.**

Con el fin de caracterizar la interacción de las amfidinolidas estudiadas con su diana molecular se evaluó, en primer lugar, la posible unión de los compuestos estudiados a los microtúbulos (estabilizados y nativos), así como su posible modulación del ensamblaje de tubulina pura *in vitro*. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que ninguno de los ligandos de la familia objeto de estudio modula dicho ensamblaje de tubulina y que los agentes testados no se unen ni a microtúbulos estabilizados ni a nativos.

Para descartar la unión de los compuestos investigados de la familia de amfidinolidas a los microtúbulos se empleó el método de desplazamiento de flutax-2 de su sitio de unión, en microtúbulos estabilizados. Dicho ensayo reveló que ninguno de los compuestos en estudio se unía al sitio del paclitaxel en los microtúbulos.

A continuación, se compararon las moléculas investigadas de la familia de amfidinolidas con el compuesto 2-metoxi-5-(2,3,4-trimetoxifenil)-2,4,6-cicloheptatrien-1-uno, conocido como MTC (figura 81). Este ligando es un análogo de la colchicina (figura 81) sin anillo B, que rápidamente alcanza el equilibrio en su reacción de unión con la tubulina, mientras que pierde parte de la energía libre de unión debido a la contribución entrópica necesaria para la inmovilización de los anillos A y C en el sitio de unión (Medrano et al., 1989).

Los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para cada ligando no presentaron disminuciones significativas de la intensidad de fluorescencia, por lo que se pudo afirmar que ninguno de los tres compuestos analizados tampoco se unían al sitio de la colchicina en los microtúbulos.



**Figura 81.** Estructuras de referencia para el estudio de desplazamiento de MTC del sitio de unión de colchicina.

Todos estos resultados indicaron, por tanto, que los microtúbulos no representan la diana de los compuestos investigados, que dichos ligandos no representan agentes estabilizantes ni desestabilizantes de microtúbulos y que la citotoxicidad observada en las líneas celulares ensayadas no es debida a la unión de los compuestos a dichos polímeros.

### 5.3. El mecanismo de acción de los compuestos estudiados consiste en la alteración del estado de agregación de la actina impidiendo la formación de los microfilamentos.

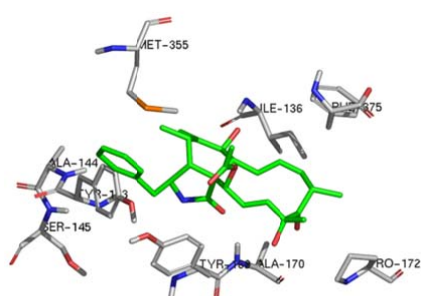
Los experimentos sobre la modulación del ensamblaje/desensamblaje de actina pusieron de manifiesto que la diana biológica de los compuestos objeto de estudio está representada por los filamentos de actina, más que por el citoesqueleto de microtúbulos. Realmente, dichos ligandos actúan mediante la inhibición del ensamblaje de actina, de la misma manera que las citocalasinas descritas previamente (Tanaka et al., 2008). Al contrario, ninguno de los agentes testados muestra efecto en la polimerización de la proteína de los microfilamentos. Se especula entonces si el mecanismo de acción encontrado para los ligandos investigados pudiera ser compartido por los otros macrólidos de la familia de amfidinolidas aún no caracterizados. La influencia del compuesto sobre el ensamblaje de actina *in vitro* es consistente con el efecto de despolimerización de los microfilamentos mostrado en las condiciones

experimentales ensayadas en las células A549 y PtK2. Desde el momento en que las amfidinolidas testadas interaccionan con la actina no ensamblada (G-actina) *in vitro*, pero sin mostrar ningún efecto sobre dicha proteína polimerizada (F-actina), se sugiere que su mecanismo de acción consistiría en la inhibición de las adiciones de los monómeros de actina a los filamentos preexistentes. Tal inhibición es similar, aunque más débil, a la inducida por citocalasina B (Tanaka et al., 2008).

#### **5.4. El sitio de unión de los compuestos estudiados se localiza en la cavidad relativamente hidrofóbica de G-actina, donde se une la citocalasina D.**

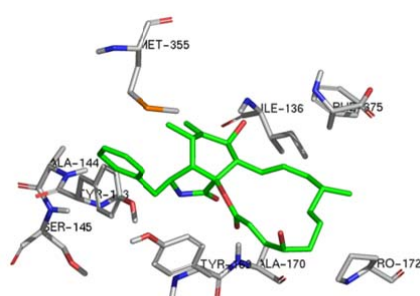
Los cálculos de *docking* realizados mediante el programa AutoDock mostraron que todos los compuestos estudiados presentan una buena interacción con la G-actina. La fiabilidad del método se evaluó mediante la reproducción del complejo de citocalasina D con esta estructura de actina, previamente descrito (Nair et al., 2008). Los modelos de unión de las amfidinolidas estudiadas, y los respectivos valores de energía libre, en comparación con los de la citocalasina D y B se muestran en la figura 82. Dichos modelos revelan que los compuestos testados solapan claramente con el sitio de unión de la citocalasina en la G-actina.





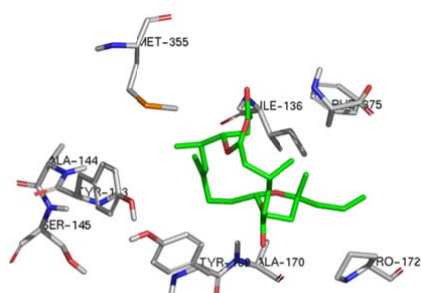
Citocalasina D

$$\Delta G_{\text{pred}} = -6.4 \text{ kcal/mol}$$



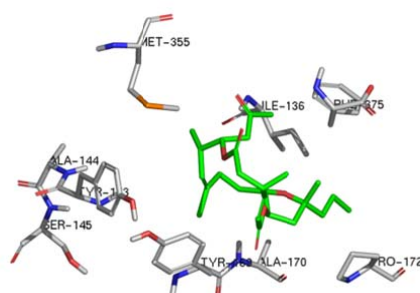
Citocalasina B

$$\Delta G_{\text{pred}} = -6.9 \text{ kcal/mol}$$



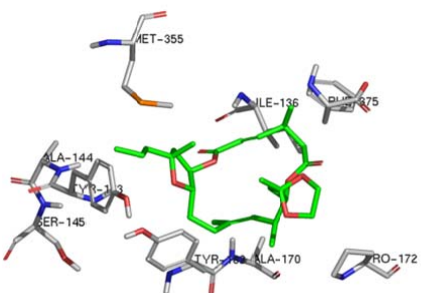
42

$$\Delta G_{\text{pred}} = -8.9 \text{ kcal/mol}$$



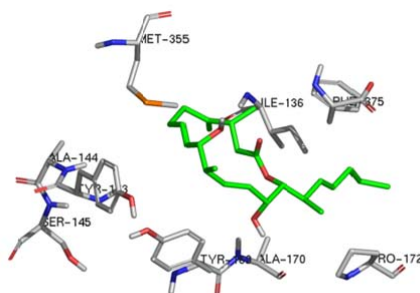
43

$$\Delta G_{\text{pred}} = -4.2 \text{ kcal/mol}$$



44

$$\Delta G_{\text{pred}} = -7.1 \text{ kcal/mol}$$



45

$$\Delta G_{\text{pred}} = -3.9 \text{ kcal/mol}$$

**Figura 82.** Modelos de unión de las citocalasinas D, B y de las amfidinolidas estudiadas a G-actina. Se muestran las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno en los distintos acoplamientos de las moléculas examinadas.

## **Conclusiones**



## 1. Familia de dictiostatina y discodermolida.

- Los compuestos estudiados exhiben la capacidad de estabilizar los microtúbulos del huso mitótico, y vencen el fenotipo de resistencia múltiple a fármacos por todos los mecanismos conocidos: MDR,  $\beta$ -III y mutaciones.
- La mayoría de los compuestos seleccionados de la familia de dictiostatina y discodermolida interaccionan sinérgicamente con otros agentes estabilizantes de microtubulos, tales como paclitaxel y pelorusido.
- Los agentes en estudio alteran el estado de agregación de la tubulina, promoviendo la formación de los microtúbulos *in vitro*, e inhiben fuertemente la unión del paclitaxel a su sitio. Al igual que el paclitaxel, los ligandos que se unen al mismo sitio muestran una marcada dependencia de la afinidad con la temperatura.
- Los valores de citotoxicidad obtenidos en presencia de los ligandos objeto de estudio se correlacionan bien con las respectivas afinidades de dichos compuestos con los microtúbulos.
- Entre las distintas modificaciones estructurales realizadas, la eliminación del metilo en posición C6, la hidrogenación del doble enlace en posición C2-C3, la sustitución de un -OH por un -OMe en posición C9 y la adición de un doble enlace en posición C4-C5 mejoran la actividad de los productos de síntesis **4**, **6**, **9** y **12**, respectivamente, en comparación con las moléculas base.
- La discodermolida se une y cosedimenta con la tubulina dimérica.
- Los productos investigados, a excepción de la molécula parental **3** y del híbrido discodermolida/dictiostatina **15**, no modifican la estructura de los microtúbulos.
- La combinación entre los datos experimentales de TR-NOE y de RMN STD y los cálculos de CORCEMA-ST indican que la discodermolida se une a un sitio

adicional en el poro tipo I de los microtúbulos. Dicho sitio es diferente del sitio de unión luminal.

## **2. Familia de pelorusido A.**

- La modificación del alcohol primario localizado en la posición C24 no influye en la actividad celular de los compuestos ensayados.
- La sustitución del alcohol primario en la posición C24 impide la unión a microtúbulos (estabilizados y nativos) y la inducción del ensamblaje de tubulina pura.
- El sitio de unión en los microtúbulos se localiza en la subunidad  $\beta$  de la tubulina.

## **3. Familia de pironetina.**

- Los análogos simplificados de la pironetina conservan una proporción medible de la actividad citotóxica del producto natural y, como éste, se clasifican como agentes desestabilizantes de microtúbulos. Sin embargo, la simplificación estructural de los análogos de pironetina resultó excesiva para mantener la elevada actividad de la molécula parental.
- Los productos de síntesis de la familia de la pironetina alteran el estado de agregación de la tubulina impidiendo la formación de los microtúbulos.
- La eliminación del grupo hidroxilo en la posición C7 no influye en la actividad de los análogos estereoisoméricos.

#### 4. Familia de podofilotoxina.

- Los epímeros  $7\beta$ -OH son significativamente más potentes que sus correspondientes análogos  $7\alpha$ -OH.

La ausencia del grupo hidroxilo en la posición C7 no influye en la actividad del compuesto en las células ensayadas.

- Las modificaciones realizadas en los compuestos objeto de estudio conservan o incluso mejoran las propiedades desestabilizantes de la podofilotoxina.
- El dímero de tubulina es la diana molecular de los compuestos estudiados, que se une al sitio de colchicina, con exclusión de los ligandos **39 $\alpha$**  y **40 $\alpha$** .

#### 5. Familia de amfidinolidas.

- La red de microfilamentos es la diana celular de los compuestos investigados.
- Los compuestos estudiados no interaccionan con los microtúbulos (estabilizados o nativos) y no se unen ni al sitio del paclitaxel ni al sitio de la colchicina.
- El mecanismo de acción de los compuestos estudiados consiste en la alteración del estado de agregación de la actina impidiendo la formación de los microfilamentos.
- El sitio de unión de los compuestos estudiados se localiza en la cavidad relativamente hidrofóbica de G-actina, donde se une la citocalasina D.



## **Bibliografia**





Abad, A., Lopez-Perez, J.L., del Olmo, E., Garcia-Fernandez, L.F., Francesch, A., Trigili, C., Barasoain, I., Andreu, J.M., Diaz, J.F., and San Feliciano, A. (2012). Synthesis and antimitotic and tubulin interaction profiles of novel pinacol derivatives of podophyllotoxins. *J Med Chem* 55, 6724-6737.

Abramowitz, M., and Stegun, I.A. (1965). *Handbook of Mathematical Functions* (New York: Dover Publications Inc.).

Ahmed, A., Hoegenauer, E.K., Enev, V.S., Hanbauer, M., Kaehlig, H., Ohler, E., and Mulzer, J. (2003). Total synthesis of the microtubule stabilizing antitumor agent laulimalide and some nonnatural analogues: the power of Sharpless' asymmetric epoxidation. *J Org Chem* 68, 3026-3042.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J. D. (1994) *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, Inc., New York & London.

Allard, J., and Mogilner, A. (2012). Traveling waves in actin dynamics and cell motility. *Curr Opin Cell Biol*.

Al-Minawi, A.Z., Lee, Y.F., Hakansson, D., Johansson, F., Lundin, C., Saleh-Gohari, N., Schultz, N., Jenssen, D., Bryant, H.E., Meuth, M., *et al.* (2009). The ERCC1/XPF endonuclease is required for completion of homologous recombination at DNA replication forks stalled by inter-strand cross-links. *Nucleic Acids Res* 37, 6400-6413.

Altmann, K.H., and Gertsch, J. (2007). Anticancer drugs from nature--natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. *Nat Prod Rep* 24, 327-357.

Alvarez, C., Alvarez, R., Corchete, P., Lopez, J.L., Perez-Melero, C., Pelaez, R., and Medarde, M. (2008). Diarylmethyloxime and hydrazone derivatives with 5-indolyl moieties as potent inhibitors of tubulin polymerization. *Bioorg Med Chem* 16, 5952-5961.

Amadori, D., Frassinetti, G.L., Zoli, W., Tienghi, A., Ravaioli, A., Casadei Giunchi, D., Gentile, A., and Salzano, E. (1996). A Phase I/II study of paclitaxel and doxorubicin in the treatment of advanced breast cancer. *Semin Oncol* 23, 19-23.

American Cancer Society, <http://www.cancer.org/>

Amos, L., and Klug, A. (1974). Arrangement of subunits in flagellar microtubules. *J Cell Sci* 14, 523-549.

Anderson, H.J., Coleman, J.E., Andersen, R.J., and Roberge, M. (1997). Cytotoxic peptides hemiasterlin, hemiasterlin A and hemiasterlin B induce mitotic arrest and abnormal spindle formation. *Cancer Chemother Pharmacol* 39, 223-226.

Andreu, J.M. (2007). Tubulin Purification. In *Methods in molecular medicine*, J. Zhou, ed. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.), pp. 17-28.

Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J., Lee, J.C., and Timasheff, S.N. (1984). Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analogues: an equilibrium study. *Biochemistry* 23, 1742-1752.

Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001). The interaction of baccatin III with the taxol binding site of microtubules determined by a homogeneous assay with fluorescent taxoid. *Biochemistry* 40, 11975-11984.

Andreu, J.M., Bordas, J., Díaz, J.F., Garcia de Ancos, J., Gil, R., Medrano, F.J., Nogales, E., Pantos, E., and Towns-Andrews, E. (1992). Low resolution structure of microtubules in solution. Synchrotron X-ray scattering and electron microscopy of taxol-induced microtubules assembled from purified tubulin in comparison with glycerol and MAP-induced microtubules. *J Mol Biol* 226, 169-184.

Andreu, J.M., Díaz, J.F., Gil, R., de Pereda, J.M., Garcia de Lacoba, M., Peyrot, V., Briand, C., Towns-Andrews, E., and Bordas, J. (1994). Solution structure of Taxotere-induced microtubules to 3-nm resolution. The change in protofilament number is linked to the binding of the taxol side chain. *J Biol Chem* 269, 31785-31792.

Andreu, J. M., De Ancos, J. G., Starling, D., Hodgkinson, J. L., and Bordas, J. (1989) A synchrotron x-ray-scattering characterization of purified tubulin and of its expansion induced by mild detergent binding. *Biochemistry* 28, 4036–4040.

Andreu, J.M., and Barasoain, I. (2001). The interaction of baccatin III with the taxol binding site of microtubules determined by a homogeneous assay with fluorescent taxoid. *Biochemistry* 40, 11975-11984.

Arai, K., Shibutani, M., and Matsuda, H. (2002). Distribution of the class II beta-tubulin in developmental and adult rat tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 52, 174-182.

Asashima, M., Fukuda, H., Ide, T., Ikeuchi, S., Ishiura, S., Kodama, T., Komazaki, S., Sato, N. and Watanabe, Y. Life science textbook, 2010.

Asociación Española contra el Cáncer, <https://www.aecc.es/>

Bagnyukova, T.V., Serebriiskii, I.G., Zhou, Y., Hopper-Borge, E.A., Golemis, E.A., Astsaturov, I. (2010). Chemotherapy and signaling: How can targeted therapies supercharge cytotoxic agents? *Cancer Biol Ther.* 10(9), 839-853.

Bai, R.L., Paull, K.D., Herald, C.L., Malspeis, L., Pettit, G.R., and Hamel, E. (1991). Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *J Biol Chem* 266, 15882-15889.

Bai, R., Durso, N.A., Sackett, D.L., and Hamel, E. (1999). Interactions of the sponge-derived antimitotic tripeptide hemiasterlin with tubulin: comparison with dolastatin 10 and cryptophycin 1. *Biochemistry* 38, 14302-14310.

Bai, R., Cichacz, Z.A., Herald, C.L., Pettit, G.R., and Hamel, E. (1993). Spongistatin 1, a highly cytotoxic, sponge-derived, marine natural product that inhibits mitosis, microtubule assembly, and the binding of vinblastine to tubulin. *Mol Pharmacol* 44, 757-766.

Bai, R., Pettit, G.R., and Hamel, E. (1990). Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. Inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain. *Biochem Pharmacol* 39, 1941-1949.

Bai, R., Pei, X.F., Boye, O., Getahun, Z., Grover, S., Bekisz, J., Nguyen, N.Y., Brossi, A., and Hamel, E. (1996). Identification of cysteine 354 of beta-tubulin as part of the binding site for the A ring of colchicine. *J Biol Chem* 271, 12639-12645.

Banerjee, A., Roach, M.C., Trcka, P., and Luduena, R.F. (1990). Increased microtubule assembly in bovine brain tubulin lacking the type III isotype of beta-tubulin. *J Biol Chem* 265, 1794–99.

Barasoain, I., Garcia-Carril, A.M., Matesanz, R., Maccari, G., Trigili, M., Mori, M., Shi, J.Z., Fang, W.S., Andreu, J.M., Botta, M., *et al.* (2010). Probing the pore drug binding site of microtubules with fluorescent taxanes: Evidence of two binding poses. *Chem Biol* 17, 243-253.

Barbazanges, M., Meyer, C., and Cossy, J. (2008). Total synthesis of amphidinolide J. *Org Lett* 10, 4489-4492.

Barnett, G.C., West, C.M., Dunning, A.M., Elliott, R.M., Coles, C.E., Pharoah, P.D., and Burnet, N.G. (2009). Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype. *Nat Rev Cancer* 9, 134-142.

Basehoar, G., and Berns, M.W. (1973). Cloning of rat kangaroo (PTK2) cells following laser microirradiation of selected mitotic chromosomes. *Science* 179(4080), 1333-4.

Bast, R.C., Jr., Zbar, B., Borsos, T., and Rapp, H.J. (1974). BCG and cancer. *N Engl J Med* 290, 1458-1469.

Begaye, A., Trostel, S., Zhao, Z., Taylor, R.E., Schriemer, D.C., and Sackett, D.L. (2011). Mutations in the beta-tubulin binding site for peloruside A confer resistance by targeting a cleft significant in side chain binding. *Cell Cycle* 10, 3387-3396.

Belani, C.P., Ramalingam, S., Perry, M.C., LaRocca, R.V., Rinaldi, D., Gable, P.S., and Tester, W.J. (2008). Randomized, phase III study of weekly paclitaxel in combination with carboplatin versus standard every-3-weeks administration of carboplatin and paclitaxel for patients with previously untreated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26, 468-473.

Bennett, M.J., Barakat, K., Huzil, J.T., Tuszynski, J., and Schriemer, D.C. (2010). Discovery and Characterization of the Laulimalide-Microtubule Binding Mode by Mass Shift Perturbation Mapping. *Chemistry & Biology* 17, 725-734.

Berenbaum, M.C. (1985). The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J Theor Biol* 114, 413-431.

Bernier, J., Hall, E.J., and Giaccia, A. (2004). Radiation oncology: a century of achievements. *Nat Rev Cancer* 4, 737-747.

Berrieman, H.K., Lind, M.J., and Cawkwell, L. (2004). Do beta-tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy? *Lancet Oncol* 5, 158-164.

Bhalla, K.N. (2003). Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene* 22, 9075-9086.

Bissery, M.C., Guenard, D., Gueritte-Voegelein, F., and Lavelle, F. (1991). Experimental antitumor activity of taxotere (RP 56976, NSC 628503), a taxol analogue. *Cancer Res* 51, 4845-4852.

Bohlin, L., and Rosen, B. (1996). Podophyllotoxin derivatives: drug discovery and development. *Drug discov.* 343-351.

Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., and Woods, C.M. (1995). Epothilones, a new class of microtubule stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* 55, 2325-2333.

Booser, D.J., and Hortobagyi, G.N. (1994). Anthracycline antibiotics in cancer therapy. Focus on drug resistance. *Drugs* 47, 223-258.

Borish, L.C., and Steinke, J.W. (2003). 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111, S460-475.

Borisy, G.G., and Taylor, E.W. (1967a). The mechanism of action of colchicine. Binding of colchicine-3H to cellular protein. *J Cell Biol* 34, 525-533.

Borisy, G.G., and Taylor, E.W. (1967b). The mechanism of action of colchicine. Colchicine binding to sea urchin eggs and the mitotic apparatus. *J Cell Biol* 34, 535-548.

Boyle, D.A., and Goldspiel, B.R. (1998). A review of paclitaxel (Taxol) administration, stability, and compatibility issues. *Clinical journal of oncology nursing* 2, 141-145.

Bradford, M.M. (1976). *Anal. Biochem* 72, 248 –254.

Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E., and Ferlay, J. (2012). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*.

Breuninger, L.M., Paul, S., Gaughan, K., Miki, T., Chan, A., Aaronson, S.A., and Kruh, G.D. (1995). Expression of multidrug resistance-associated protein in

NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res* 55, 5342-5347.

Brinkley, B.R. (1985). Microtubule organizing centers. *Annu Rev Cell Biol* 1, 145-72.

Budman, D.R., and Calabro, A. (2002). In vitro search for synergy and antagonism: evaluation of docetaxel combinations in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 74, 41-46.

Buey, R.M., Calvo, E., Barasoain, I., Pineda, O., Edler, M.C., Matesanz, R., Cerezo, G., Vanderwal, C.D., Day, B.W., Sorensen, E.J., *et al.* (2007). Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nature Chem Biol* 3, 117-125.

Buey, R.M., Barasoain, I., Jackson, E., Meyer, A., Giannakakou, P., Paterson, I., Mooberry, S., Andreu, J.M., and Díaz, J.F. (2005). Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chem. Biol.* 12, 1269-1279.

Buey, R.M., Diaz, J.F., Andreu, J.M., O'Brate, A., Giannakakou, P., Nicolaou, K.C., Sasmal, P.K., Ritzen, A., and Namoto, K. (2004). Interaction of epothilone analogs with the paclitaxel binding site: relationship between binding affinity, microtubule stabilization, and cytotoxicity. *Chem Biol* 11, 225-236.

Burgoyne, R.D., Cambray-Deakin, M.A., Lewis, S.A., Sarkar, S., and Cowan, N.J. (1988). Differential distribution of beta-tubulin isotypes in cerebellum. *EMBO J* 7, 2311-2319.

Burkhardt, C.A., Kavallaris, M., and Horwitz, S.B. (2001). The role of  $\beta$ -tubulin isotypes in resistance to antimitotic drugs. *Biochim Biophys Acta* 1471, 1–9.

Campisi, J. (2003). Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer* 3, 339-349.

Canales, A., Salarichs, J.R., Trigili, C., Nieto, L., Coderch, C., Andreu, J.M., Paterson, I., Jiménez-Barbero, J., and Díaz, J.F. (2011). Insights into the interaction of discodermolide and docetaxel with dimeric tubulin. Mapping the binding sites of microtubule-stabilizing agents using an integrated NMR and computational approach. *ACS Chemical Biology* 6, 789-799.

Canales, A., Matesanz, R., Gardner, N.M., Andreu, J.M., Paterson, I., Diaz, J.F., and Jimenez-Barbero, J. (2008). The bound conformation of microtubule-stabilizing agents: NMR insights into the bioactive 3D structure of discodermolide and dictyostatin. *Chemistry* 14, 7557-7569.

Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/>

Carlier, M.F., Didry, D., and Valentin-Ranc, C. (1991). Interaction between chromium GTP and tubulin. Stereochemistry of GTP binding, GTP hydrolysis, and microtubule stabilization. *J Biol Chem* 266, 12361-12368.

Cassimeris, L.U., Walker, R.A., Pryer, N.K., and Salmon, E.D. (1987). Dynamic instability of microtubules. *Bioessays* 7, 149-154.

Cassimeris, L. (1993). Regulation of microtubule dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 26, 275-281.

Castro, J.A., de Mecca, M.M., and Bartel, L.C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & experimental toxicology* 25, 471-479.

Castro, M.A., del Corral, J.M., Garcia, P.A., Rojo, M.V., de la Iglesia-Vicente, J., Mollinedo, F., Cuevas, C., and San Feliciano, A. (2010). Synthesis and biological evaluation of new podophyllic aldehyde derivatives with cytotoxic and apoptosis-inducing activities. *J Med Chem* 53, 983-993.

Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, <http://www.cdc.gov/>

Chabner, B.A., and Roberts, T.G., Jr. (2005). Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 65-72.

Chakrabarti, G., Kim, S., Gupta, M.L., Jr., Barton, J.S., and Himes, R.H. (1999). Stabilization of tubulin by deuterium oxide. *Biochemistry* 38, 3067-3072.

Chan, C., Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol* 19, 537-545.

Chang, H., Shyu, K.G., Lee, C.C., Tsai, S.C., Wang, B.W., Hsien Lee, Y., and Lin, S. (2003). GL331 inhibits HIF-1 $\alpha$  expression in a lung cancer model. *Biochem Biophys Res Commun* 302, 95-100.



Checchi, P.M., Nettles, J.H., Zhou, J., Snyder, J.P., and Joshi, H.C. (2003). Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol Sci* 24, 361-365.

Chen, S.M., Meng, L.H., and Ding, J. (2010). New microtubule-inhibiting anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 329-343.

Chen, H., Bernstein, B.W., and Bamburg, J.R. (2000). Regulating actin-filament dynamics in vivo. *Trends Biochem Sci* 25, 19-23.

Chou, T.C., and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* 22, 27-55.

Chrétien, D., and Wade, R.H. (1991). New data on the microtubule surface lattice. *Biology of the Cell* 71, 161-174.

Chrétien, D., Jáinosi, I., Taveau, J.C., and Flyvbjerg, H. (1999). Microtubule's conformational cap. *Cell Struct Funct* 24, 299-303.

Chrétien, D., Metoz, F., Verde, F., Karsenti, E., and Wade, R.H. (1992). Lattice defects in microtubules: protofilament numbers vary within individual microtubules. *J Cell Biol* 117, 1031-1040.

Clinical Trials. <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=etoposide> (893 study references found by May 2, 2011).

Colditz, G.A., Sellers, T.A., and Trapido, E. (2006). Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer* 6, 75-83.

Cole, W.H., and Everson, T.C. (1956). Spontaneous regression of cancer: preliminary report. *Ann Surg* 144, 366-383.

Coleman, J.E., de Silva, E.D., Kong, F., Andersen, R.J., Allen, T.M., (1995). *Tetrahedron* 51, 10653-10662.

Collier, H.O., Grimshaw, J.J., and Huskinson, P.L. (1957). Detection and measurement of antagonism to folic acid. *British journal of pharmacology and chemotherapy* 12, 521-528.

Corey, E.J and Cheng, X.M. (1989). *The Logic of Chemical Synthesis*, John Wiley and Sons.

Corley, D.G., Herb, R., Moore, R.E., Scheur, P.J., and Paul, V.J. (1988). Laulimalide. New potent cytotoxic macrolides from a marine sponge and a nudibranch predator. *J. Org. Chem.* 53, 3644-3646.

Correia, J.J., and Lobert, S. (2001). Physiochemical aspects of tubulin-interacting antimitotic drugs. *Curr Pharm Des* 7, 1213-1228.

Cotran, S.R., Robbins, S.L., and Kuma, V. (1999). *Patología estructural y funcional*. Editorial McGraw-Hill.

Cutts, J.H., Beer, C.T., and Noble, R.L. (1960). Biological properties of Vincalkeboblantine, an alkaloid in *Vinca rosea* Linn, with reference to its antitumor action. *Cancer Res* 20, 1023-1031.

de Ines, C., Leynadier, D., Barasoain, I., Peyrot, V., Garcia, P., Briand, C., Rener, G.A., and Temple, C., Jr. (1994). Inhibition of microtubules and cell cycle arrest by a new 1-deaza-7,8-dihydropteridine antitumor drug, CI 980, and by its chiral isomer, NSC 613863. *Cancer Res* 54, 75-84.

De la Cruz Caro, F. (1968). [Surgery of advanced mammary cancer]. *Anales de la Real Academia Nacional de Medicina* 85, 293-317.

Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., and Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer* 104, 1129-1137.

Delord, J.P., Dalenc, F., Pinguet, F., Nguyen, L., Lochon, I., Poubanc, M., Chatelut, E., and Roche, H. (2007). A phase I dose-escalating and pharmacokinetic study of docetaxel and vinorelbine as first-line chemotherapy for metastatic breast cancer. *Oncology* 72, 322-325.

Desai, A., and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.

Dewick, P.M. (2002). *Medicinal Natural Products*, John Wiley and Sons, 2<sup>a</sup> Ed.

Díaz, J.F., and Andreu, J.M. (1993). Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry* 32, 2747-2755.

Díaz, J.F., Barasoain, I., and Andreu, J.M. (2003). Fast kinetics of Taxol binding to microtubules. Effects of solution variables and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 278, 8407-8419.

Díaz, J.F., Strobe, R., Engelborghs, Y., Souto, A.A., and Andreu, J.M. (2000). Molecular recognition of taxol by microtubules. Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *J Biol Chem* 275, 26265-26276.

Díaz, J.F., and Buey, R.M. (2007). Characterizing Ligand-Microtubule Binding by Competition Methods. In *Methods in molecular medicine*, J. Zhou, ed. (Totowa, NJ: Humana Press Inc.), pp. 245-260.

Díaz, J.F., Pantos, E., Bordas, J., and Andreu, J.M. (1994). Solution structure of GDP-tubulin double rings to 3 nm resolution and comparison with microtubules. *J Mol Biol* 238, 214-225.

Díaz, J.F., Valpuesta, J.M., Chacon, P., Diakun, G., and Andreu, J.M. (1998). Changes in microtubule protofilament number induced by Taxol binding to an easily accessible site. Internal microtubule dynamics. *J Biol Chem* 273, 33803-33810.

Dillman, R. O. (2011). Cancer immunotherapy. *Cancer Biother Radiopharm* 26, 1-64.

Dorland, (2003) *Dorland Diccionario enciclopédico ilustrado de Medicina*. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. Madrid.

Downing, K.H., and Nogales, E. (1999). Crystallographic structure of tubulin: implications for dynamics and drug binding. *Cell Struct Funct* 24, 269-275.

Downing, K.H., and Nogales, E. (1998). New insights into microtubule structure and function from the atomic model of tubulin. *Eur Biophys J* 27, 431-436.

Dràber, P., Sulimenko, V., and Draberova, E. (2012). Cytoskeleton in mast cell signaling. *Frontiers in immunology* 3, 130.

Drewinko, B., Romsdahl, M.M., Yang, L.Y., Ahearn, M.J., and Trujillo, J. M. (1976). Establishment of a human carcinoembryonic antigen-producing colon adenocarcinoma cell line. *Cancer Res* 36, 467-475.

Duflos, A., Kruczynski, A., and Barret, J.M. (2002). Novel aspects of natural and modified vinca alkaloids. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2, 55-70.

Dumontet, C., and Jordan, M.A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 9, 790-803.

Eriksson, J.E., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H.M., and Goldman, R.D. (2009). Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119, 1763-1771.

Evangelio, J.A., Abal, M., Barasoain, I., Souto, A.A., Lillo, M.P., Acuna, A.U., Amat-Guerri, F., and Andreu, J.M. (1998). Fluorescent taxoids as probes of the microtubule cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 39, 73-90.

Felip, E., Massuti, B., Camps, C., Benito, D., Isla, D., Gonzalez-Larriba, J.L., Lopez-Cabrerizo, M.P., Salamanca, O., Puerto-Pica, J., Moyano, A., *et al.* (1998). Superiority of sequential versus concurrent administration of paclitaxel with etoposide in advanced non-small cell lung cancer: comparison of two Phase II trials. *Clin Cancer Res* 4, 2723-2728.

Fenteany, G., and Zhu, S. (2003). Small-molecule inhibitors of actin dynamics and cell motility. *Curr Top Med Chem* 3, 593-616.

Fesik, S.W. (2005). Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5, 876-885.

Fitzgerald, T.J. (1976). Molecular features of colchicine associated with antimetabolic activity and inhibition of tubulin polymerization. *Biochem Pharmacol* 25, 1383-1387.

Florence, G.J., Garden, N.M., and Paterson, I. (2008). Development of practical syntheses of the marine anticancer agents discodermolide and dyctiosatin. *Nat Prod Rep* 25, 342-375.

Furstner, A., Kattnig, E., and Lepage, O. (2006). Total syntheses of amphidinolide X and Y. *J Am Chem Soc* 128, 9194-9204.

Gaitanos, T.N., Buey, R.M., Díaz, J.F., Northcote, P.T., Teesdale-Spittle, P., Andreu, J.M., and Miller, J.H. (2004). Peloruside A does not bind to the taxoid site on beta-tubulin and retains its activity in multidrug-resistant cell lines. *Cancer Res* 64, 5063-5067.

Gapud, E.J., Bai, R., Ghosh, A.K., and Hamel, E. (2004). Laulimalide and paclitaxel: a comparison of their effects on tubulin assembly and their synergistic action when present simultaneously. *Mol Pharmacol* 66, 113-121.

Garland, D.L. (1978). Kinetics and mechanism of colchicine binding to tubulin: evidence for ligand-induced conformational change. *Biochemistry* 17, 4266-4272.

Gertsch, J., Meier, S., Muller, M., and Altmann, K.H. (2009). Differential effects of natural product microtubule stabilizers on microtubule assembly: single agent and combination studies with taxol, epothilone B, and discodermolide. *Chembiochem* 10, 166-175.

Giannakakou, P., Sackett, D.L., Kang, Y.K., Zhan, Z., Buters, J.T., Fojo, T., and Poruchynsky, M.S. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* 272, 17118-17125.

Giannakakou, P., Gussio, R., Nogales, E., Downing, K.H., Zaharevitz, D., Bollbuck, B., Poy, G., Sackett, D., Nicolaou, K.C., and Fojo, T. (2000). A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(6), 2904-9.

Giannakakou, P., and Fojo, T. (2000). Discodermolide: just another microtubule-stabilizing agent? No! A lesson in synergy. *Clin Cancer Res* 6, 1613-1615.

Giannakakou, P., Sackett, D.L., Kang, Y.K., Zhan, Z., Buters, J.T., Fojo, T., and Poruchynsky, M.S. (1997). Paclitaxel-resistant human ovarian cancer cells have mutant beta-tubulins that exhibit impaired paclitaxel-driven polymerization. *J Biol Chem* 272, 17118-17125.

Gibbs, J.B. (2000). Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 287, 1969-1973.

Gigant, B., Wang, C., Ravelli, R.B., Roussi, F., Steinmetz, M.O., Curmi, P.A., Sobel, A., and Knossow, M. (2005). Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 435, 519-522.

Giganti, A., and Friederich, E. (2003). The actin cytoskeleton as a therapeutic target: state of the art and future directions. *Progress in cell cycle research* 5, 511-525.

Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 713-726.

Gomes, F.G., Nedel, F., Alves, A.M., Nor, J.E., and Tarquinio, S.B. (2012). Tumor angiogenesis and lymphangiogenesis: Tumor/endothelial crosstalk and cellular/microenvironmental signaling mechanisms. *Life sciences*.

Gordaliza, M., Castro, M.A., Garcia-Gravalos, M.D., Ruiz, P., Miguel del Corral, J.M., and San Feliciano, A. (1994). Antineoplastic and antiviral activities of podophyllotoxin related lignans. *Archiv der Pharmazie* 327, 175-179.

Gould, R.R., Borisy, G.G. (1977). The pericentriolar material in Chinese hamster ovary cells nucleates microtubule formation. *J Cell Biol* 73(3), 601-15.

Gridelli, C., Aapro, M., Ardizzoni, A., Balducci, L., De Marinis, F., Kelly, K., Le Chevalier, T., Manegold, C., Perrone, F., Rosell, R., *et al.* (2005). Treatment of advanced non-small-cell lung cancer in the elderly: results of an international expert panel. *J Clin Oncol* 23, 3125-3137.

Gunasekera, S.P., Cranick, S., and Longley, R.E. (1989). Immunosuppressive compounds from a deep water marine sponge, *Agelas flabelliformis*. *J Nat Prod* 52, 757-761.

Gunasekera, S.P., Gunasekera, M., Longley, R.E., and Schulte, G.K. (1990). Discodermolide - a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *J Org Chem* 55, 4912-4915.

Gupta, S., Das, L., Datta, A.B., Poddar, A., Janik, M.E., and Bhattacharyya, B. (2006). Oxalone and lactone moieties of podophyllotoxin exhibit properties of both the B and C rings of colchicine in its binding with tubulin. *Biochemistry* 45, 6467-6475.

Hamel, E., del Campo, A.A., Lowe, M.C., and Lin, C.M. (1981). Interactions of taxol, microtubule-associated proteins, and guanine nucleotides in tubulin polymerization. *J Biol Chem* **256**, 11887-11894.

Hamel, E. (1992). Natural-products which interact with tubulin in the vinca domain - maytansine, rhizoxin, phomopsin-A, dolastatin-10 and dolastatin-15 and halicondrin-B. *Pharmacology & Therapeutics* **55**, 31-51.

Hamel, E., and Lin, C.M. (1983). Interactions of combretastatin, a new plant-derived antimitotic agent, with tubulin. *Biochem Pharmacol* **32**, 3864-3867.

Hamel, E., Day, B.W., Miller, J.H., Jung, M.K., Northcote, P.T., Ghosh, A.K., Curran, D.P., Cushman, M., Nicolaou, K.C., Paterson, I., *et al.* (2006). Synergistic effects of peloruside A and laulimalide with taxoid site drugs, but not with each other, on tubulin assembly. *Mol Pharmacol* **70**, 1555-1564.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674.

Hande, K.R. (1998). Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *Eur J Cancer* **34**, 1514-1521.

Hanessian, S. (2006). Structure-based organic synthesis of drug prototypes: a personal odyssey. *ChemMedChem* **1**, 1301-1330.

Hari, M., Yang, H., Zeng, C., Canizales, M., and Cabral, F. (2003). Expression of class III beta-tubulin reduces microtubule assembly and confers resistance to paclitaxel. *Cell Motil Cytoskeleton* **56**, 45-56.

Harris, A.L., and Hochhauser, D. (1992). Mechanisms of multidrug resistance in cancer treatment. *Acta Oncol.* **31**, 205-13.

Hasegawa, S., Miyoshi, Y., Egawa, C., Ishitobi, M., Tamaki, Y., Monden, M., and Noguchi, S. (2002). Mutational analysis of the class I beta-tubulin gene in human breast cancer. *Int J Cancer* **101**, 46-51.

Haskins, K.M., Donoso, J.A., and Himes, R.H. (1981). Spirals and paracrystals induced by Vinca alkaloids: evidence that microtubule-associated proteins act as polycations. *J Cell Sci* **47**, 237-247.

Hayden, J.H., Bowser, S.S., and Rieder, C.L. (1990). Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J Cell Biol* **111**, 1039-1045.

He, L., Orr, G.A., and Horwitz, S.B. (2001). Novel molecules that interact with microtubules and have functional activity similar to Taxol. *Drug Discov Today* 6, 1153-1164.

Heinrichs, A. (2009). Cytoskeleton: The making of a filament. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 164.

Hennessy, M., and Spiers, J.P. (2007). A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* 55, 1-15.

Henre, W. J. (2003). *A Guide to Molecular Mechanism and Quantum Chemical Calculations*; Wavefunction, Inc.: Irvine, CA.

Herrmann, H., Strelkov, S.V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009). Intermediate filaments: primary determinants of cell architecture and plasticity. *J Clin Invest* 119, 1772-1783.

Herrmann, H., and Aebi, U. (2004). Intermediate filaments: molecular structure, assembly mechanism, and integration into functionally distinct intracellular Scaffolds. *Annu Rev Biochem* 73, 749-789.

Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., and Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 562-573.

Herrmann, H., Haner, M., Brettel, M., Muller, S.A., Goldie, K.N., Fedtke, B., Lustig, A., Franke, W.W., and Aebi, U. (1996). Structure and assembly properties of the intermediate filament protein vimentin: the role of its head, rod and tail domains. *J Mol Biol* 264, 933-953.

Hess, J.F., Budamagunta, M.S., Voss, J.C., and FitzGerald, P.G. (2004). Structural characterization of human vimentin rod 1 and the sequencing of assembly steps in intermediate filament formation in vitro using site-directed spin labeling and electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem* 279, 44841-44846.

Honore, S., Pasquier, E., and Braguer, D. (2005). Understanding microtubule dynamics for improved cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 62, 3039-3056.

Honore, S., Kamath, K., Braguer, D., Horwitz, S.B., Wilson, L., Briand, C., and Jordan, M.A. (2004). Synergistic suppression of microtubule dynamics by



discodermolide and paclitaxel in non-small cell lung carcinoma cells. *Cancer Res* 64, 4957-4964.

Honore, S., and Braguer, D. (2011). Investigating microtubule dynamic instability using microtubule-targeting agents. *Methods Mol Biol* 777, 245-260.

Hood, K.A., West, L.M., Rouwe, B., Northcote, P.T., Berridge, M.V., Wakefield, S.J., and Miller, J.H. (2002). Peloruside A, a novel antimitotic agent with paclitaxel-like microtubule- stabilizing activity. *Cancer Res* 62, 3356-3360.

Hopper-Borge, E., Chen, Z.S., Shchaveleva, I., Belinsky, M.G., and Kruh, G.D. (2004). Analysis of the drug resistance profile of multidrug resistance protein 7 (ABCC10): resistance to docetaxel. *Cancer Res* 64, 4927-4930.

Hotani, H., and Horio, T. (1988). Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton* 10, 229-236.

Huang, G.S., Lopez-Barcons, L., Freeze, B.S., Smith, A.B., 3rd, Goldberg, G.L., Horwitz, S.B., and McDaid, H.M. (2006). Potentiation of taxol efficacy and by discodermolide in ovarian carcinoma xenograft-bearing mice. *Clin Cancer Res* 12, 298-304.

Hudes, G.R., Greenberg, R., Krigel, R.L., Fox, S., Scher, R., Litwin, S., Watts, P., Speicher, L., Tew, K., and Comis, R. (1992). Phase II study of estramustine and vinblastine, two microtubule inhibitors, in hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 10, 1754-1761.

Hudes, G.R., Nathan, F., Khater, C., Haas, N., Cornfield, M., Giantonio, B., Greenberg, R., Gomella, L., Litwin, S., Ross, E., *et al.* (1997). Phase II trial of 96-hour paclitaxel plus oral estramustine phosphate in metastatic hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol* 15, 3156-3163.

Huisman, M.T., Chhatta, A.A., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., and Schinkel, A.H. (2005). MRP2 (ABCC2) transports taxanes and confers paclitaxel resistance and both processes are stimulated by probenecid. *Int J Cancer* 116, 824-829.

Hung, D.T., Nerenberg, J.B., and Schreiber, S.L. (1994). Distinct binding and cellular properties of synthetic (+)- and (-)-discodermolides. *Chem Biol* 1, 67-71.

Huzil, J.T., Chik, J.K., Slys, G.W., Freedman, H., Tuszynski, J., Taylor, R.E., Sackett, D.L., and Schriemer, D.C. (2008). A unique mode of microtubule stabilization induced by peloruside A. *J Mol Biol* 378, 1016-1030.

Imbert, T.F. (1998). Discovery of podophyllotoxins. *Biochimie* 80, 207-222.

Infante, J.R., Yardley, D.A., Burris, H.A., 3rd, Greco, F.A., Farley, C.P., Webb, C., Spigel, D.R., and Hainsworth, J.D. (2009). Phase II trial of weekly docetaxel, vinorelbine, and trastuzumab in the first-line treatment of patients with HER2-positive metastatic breast cancer. *Clinical breast cancer* 9, 23-28.

Instituto Nacional del Cáncer, <http://www.cancer.gov/>

Isaacs, A., and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society* 147, 258-267.

Isaacs, A., Lindenmann, J., and Valentine, R.C. (1957). Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character Royal Society* 147, 268-273.

Isbrucker, R.A., Cummins, J., Pomponi, S.A., Longley, R.E., and Wright, A.E. (2003). Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochem Pharmacol* 66, 75-82.

Ishikawa, H., Bischoff, R., and Holtzer, H. (1968). Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* 38, 538-555.

Issell, B.F. (1982). The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26. *Cancer Chemother Pharmacol* 7, 73-80.

Izushi, K., Fujiwara, Y., and Tasaka, K. (1992). Identification of vimentin in rat peritoneal mast cells and its phosphorylation in association with histamine release. *Immunopharmacology* 23, 153–161.

Jardine, I., in: Cassady, J.M., and Douros, J. (1980). *Anticancer agents based on natural product models*. Academic press, New York. 319-351.

Jefford, C.W., Bernardinelli, G., Tanaka, J., and Higa, T. (1996). Structures and absolute configurations of the marine toxins, latrunculin A and laulimalide. *Tetrahedron Lett* 37, 159-162.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.

Jiménez-Barbero, J., Canales, A., Northcote, P.T., Buey, R.M., Andreu, J.M., and Díaz, J.F. (2006). NMR determination of the bioactive conformation of peloruside a bound to microtubules. *J Am Chem Soc* 128, 8757-8765.

Jiménez-Barbero, J., Souto, A.A., Abal, M., Barasoain, I., Evangelio, J.A., Acuña, A.U., Andreu, J.M., and Amat-Guerri, F. (1998). Effect of 2'-OH acetylation on the bioactivity and conformation of 7-O-[N-(4'-fluoresceincarbonyl)-L-alanyl]taxol. A NMR-fluorescence microscopy study. *Bioorg Med Chem* 6, 1857-1863.

Joe, P.A., Banerjee, A., and Ludueña, R.F. (2008). The roles of cys124 and ser239 in the functional properties of human betaIII tubulin. *Cell Motil Cytoskeleton* 65(6), 476-86.

Jolivet, J., Cowan, K.H., Curt, G.A., Clendeninn, N.J., and Chabner, B.A. (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N Engl J Med* 309, 1094-1104.

Jordan, A., Hadfield, J.A., Lawrence, N.J., and McGown, A.T. (1998). Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 18, 259-296.

Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 4, 253-265.

Jordan, M.A., Toso, R.J., Thrower, D., and Wilson, L. (1993). Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 9552-9556.

Jordan, M.A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W.B., Copp, H., and Wilson, L. (1996). Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Res* 56, 816-825.

Jordan, M.A., Margolis, R.L., Himes, R.H., and Wilson, L. (1986). Identification of a distinct class of vinblastine binding sites on microtubules. *J Mol Biol* 187, 61-73.

Jordan, M.A., Thrower, D., and Wilson, L. (1991). Mechanism of inhibition of cell proliferation by Vinca alkaloids. *Cancer Res* 51, 2212-2222.

Jordan, M.A., Thrower, D., and Wilson, L. (1992). Effects of vinblastine, podophyllotoxin and nocodazole on mitotic spindles. Implications for the role of microtubule dynamics in mitosis. *J Cell Sci* 102 ( Pt 3), 401-416.

Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Crystallogr D* 66, 125.

Kamath, K., Wilson, L., Cabral, F., and Jordan, M.A. (2005). Beta III-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *J Biol Chem* 280, 12 902–07.

Kanakkanthara, A., Wilmes, A., O'Brate, A., Escuin, D., Chan, A., Gjyzezi, A., Crawford, J., Rawson, P., Kivell, B., Northcote, P.T., *et al.* (2011). Peloruside- and laulimalide-resistant human ovarian carcinoma cells have betaII-tubulin mutations and altered expression of betaII- and betaIII-tubulin isoforms. *Mol Cancer Ther* 10, 1419-1429.

Kaplan, H.S. (1970) Radiobiology's contribution to radiotherapy: promise or mirage? *Radiat. Res.* 43, 460-476.

Karran, P., and Attard, N. (2008). Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* 8, 24-36.

Kavallaris, M. (2010). Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 10, 194-204.

Kavallaris, M., Kuo, D.Y., Burkhart, C.A., Regl, D.L., Norris, M.D., Haber, M., and Horwitz, S.B. (1997). Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms. *J Clin Invest* 100, 1282–93.

Kavallaris, M., Burkhart, C.A., and Horwitz, S.B. (1999). Antisense oligonucleotides to class III beta-tubulin sensitize drug-resistant cells to Taxol. *Br J Cancer* 80, 1020-1025.

Kaye, S.B. (1998). New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *Br J Cancer.* 3, 1-7.

Kelly, M., and Hartwell, J.L. (1954). The biological effects and the chemical composition of podophyllin: a review. *J Natl Cancer Inst* 14, 967-1010.

Keren-Rosenberg, S., and Muggia, F.M. (1997). Response to estramustine phosphate and paclitaxel in patients with advanced breast cancer: a phase I study. *Semin Oncol* 24, S26-29.

Kerksiek, K., Mejillano, M.R., Schwartz, R.E., Georg, G.I., and Himes, R.H. (1995). Interaction of cryptophycin 1 with tubulin and microtubules. *FEBS Lett* 377, 59-61.

Khrapunovich-Baine, M., Menon, V., Verdier-Pinard, P., Smith, A.B., 3rd, Angeletti, R.H., Fiser, A., Horwitz, S.B., and Xiao, H. (2009). Distinct pose of discodermolide in taxol binding pocket drives a complementary mode of microtubule stabilization. *Biochemistry* 48, 11664-11677.

Khrapunovich-Baine, M., Menon, V., Yang, C.P., Northcote, P.T., Miller, J.H., Angeletti, R.H., Fiser, A., Horwitz, S.B., and Xiao, H. (2011). Hallmarks of molecular action of microtubule stabilizing agents: effects of epothilone B, ixabepilone, peloruside A, and laulimalide on microtubule conformation. *J Biol Chem* 286, 11765-11778.

Kim do, Y., Kim, K.H., Kim, N.D., Lee, K.Y., Han, C.K., Yoon, J.H., Moon, S.K., Lee, S.S., and Seong, B.L. (2006). Design and biological evaluation of novel tubulin inhibitors as antimitotic agents using a pharmacophore binding model with tubulin. *J Med Chem* 49, 5664-5670.

Kinghorn, G.R., McMillan, A., Mulcahy, F., Drake, S., Lacey, C., and Bingham, J.S. (1993). An open, comparative, study of the efficacy of 0.5% podophyllotoxin lotion and 25% podophyllotoxin solution in the treatment of condylomata acuminata in males and females. *Int J STD AIDS* 4(4), 194-199.

Kinoshita, K., Noetzel, T.L., Pelletier, L., Mechtler, K., Drechsel, D.N., Schwager, A., Lee, M., Raff, J.W., and Hyman, A.A. (2005). Aurora A phosphorylation of TACC3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *J Cell Biol.* 107, 1047-1055.

Kirschner, M.W., and Mitchison, T. (1986). Microtubule dynamics. *Nature* 324, 621.

Klaassen, U., Wilke, H., Weyhofen, R., Harstrick, A., Eberhardt, W., Muller, C., Korn, M., Hanske, M., Diergarten, K., and Seeber, S. (1998). Phase II study

with cisplatin and paclitaxel in combination with weekly high-dose 24 h infusional 5-fluorouracil/leucovorin for first-line treatment of metastatic breast cancer. *Anticancer Drugs* 9, 203-207.

Kluza, J., Mazinghien, R., Irwin, H., Hartley, J.A., and Bailly, C. (2006). Relationships between DNA strand breakage and apoptotic progression upon treatment of HL-60 leukemia cells with tafluposide or etoposide. *Anticancer Drugs* 17, 155-164.

Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Harada, T., Nishide, M., Kurokawa, T., Nakagawa, T., Shimada, N., and Kobayashi, K. (1994a). Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. I. Taxonomy, production, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 47, 697-702.

Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Kurokawa, T., Nakagawa, T., Shimada, N., and Iitaka, Y. (1994b). Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. II. Structural elucidation. *J Antibiot* 47, 703-707.

Kobayashi, J., Shimbo, K., Sato, M., Shiro, M., and Tsuda, M. (2000). Absolute stereochemistry of amphidinolides G and H. *Org Lett* 2, 2805-2807.

Kobayashi, J., and Tsuda, M. (2004). Amphidinolides, bioactive macrolides from symbiotic marine dinoflagellates. *Nat Prod Rep* 21, 77-93.

Kobayashi, J., and Kubota, T. (2007). Bioactive macrolides and polyketides from marine dinoflagellates of the genus *Amphidinium*. *J Nat Prod* 70, 451-460.

Kobayashi, J., Sato, M., and Ishibashi, M. (1993). Amphidinolide-J- a cytotoxic macrolide from the marine dinoflagellate *Amphidinium* Sp. Determination of the absolute stereochemistry. *Journal of Organic Chemistry* 58, 2645-2646.

Kobayashi, J., Shimbo, K., Sato, M., and Tsuda, M. (2002). Amphidinolides H2-H5, G2, and G3, new cytotoxic 26-and 27-membered macrolides from dinoflagellate *Amphidinium* sp. *Journal of Organic Chemistry* 67, 6585-6592.

Koç, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K., and Merrill, G.F. (2004). Hydroxyurea arrests DNA replication by a mechanism that preserves basal dNTP pools. *J Biol Chem* 279, 223-230.

Kondoh, M., Usui, T., Kobayashi, S., Tsuchiya, K., Nishikawa, K., Nishikiori, T., Mayumi, T., and Osada, H. (1998). Cell cycle arrest and antitumor activity of pironetin and its derivatives. *Cancer Lett* 126, 29-32.

Kondoh, M., Usui, T., Nishikiori, T., Mayumi, T., and Osada, H. (1999). Apoptosis induction via microtubule disassembly by an antitumour compound, pironetin. *Biochem J* 340 (Pt 2), 411-416.

Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1 pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem* 114 (1), 33-38.

Kowalski, R.J., Giannakakou, P., Gunasekera, S.P., Longley, R.E., Day, B.W., and Hamel, E. (1997). The microtubule-stabilizing agent discodermolide competitively inhibits the binding of paclitaxel (Taxol) to tubulin polymers, enhances tubulin nucleation reactions more potently than paclitaxel, and inhibits the growth of paclitaxel-resistant cells. *Mol Pharmacol* 52, 613-622.

Krauh, E., Little, M., Kempf, T., Hofer-Warbinek, R., Ade, W., and Ponstingl, H. (1981). Complete amino acid sequence of beta-tubulin from porcine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 4156-4160.

Kreis, T., and Vale, R. (1999). *Guide-book to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford: Oxford University Press.

Kumar, N. (1981). Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action. *J Biol Chem* 256, 10435-10441.

Lai, D., Visser-Grieve, S., and Yang, X. (2012). Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Bioscience reports* 32, 361-374.

Lake, R.A., and Robinson, B.W. (2005). Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer* 5, 397-405.

Lakowicz, J. (1999). *Principles of fluorescence spectroscopy* (New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers).

La Regina, G., Edler, M.C., Brancale, A., Kandil, S., Coluccia, A., Piscitelli, F., Hamel, E., De Martino, G., Matesanz, R., Díaz, J.F., Scovassi, A.I., Prosperi, E., Lavecchia, A., Novellino, E., Artico, M., and Silvestri, R. (2007). Arylthioindole inhibitors of tubulin polymerization. 3. Biological evaluation, structure-activity relationships and molecular modeling studies. *Journal of medicinal chemistry* 50, 2865-2874.

Laue, T.M., Shah, B.D., Ridgeway, T.M., and Pelletier, S.L. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical Ultracentrifugation in Biochemistry and Polymer Science*, S.E. Harding, Rowe, A.J. and Horton, J.C., ed. (Cambridge: Royal Society of Chemistry), pp. 90-125.

Lazarides, E. (1982). Biochemical and immunocytological characterization of intermediate filaments in muscle cells. *Methods Cell Biol* 25 (*Pt B*), 333-357.

Lee, K.H., Beers, S.A., Mori, M., Wang, Z.Q., Kuo, Y.H., Li, L., Liu, S.Y., Chang, J.Y., Han, F.S., and Cheng, Y.C. (1990). Antitumor agents. 111. New 4-hydroxylated and 4-halogenated anilino derivatives of 4'-demethylepipodophyllotoxin as potent inhibitors of human DNA topoisomerase II. *J Med Chem* 33, 1364-1368.

Lee, J.C., Frigon, R.P., and Timasheff, S.N. (1973). The chemical characterization of calf brain microtubule protein subunits. *J Biol Chem* 248, 7253-7262.

Lepage, O., Kattnig, E., and Furstner, A. (2004). Total synthesis of amphinolide X. *J Am Chem Soc* 126, 15970-15971.

Levitsky, D.I., Pivovarova, A.V., Mikhailova, V.V., and Nikolaeva, O.P. (2008). Thermal unfolding and aggregation of actin. *FEBS J* 275, 4280-4295.

Lewis, S.A., Gilmartin, M.E., Hall, J.L., and Cowan, N.J. (1985). Three expressed sequences within the human beta-tubulin multigene family each define a distinct isotype. *J Mol Biol* 182, 11-20.

Leza, J.C., Lizasoain, I., Fernández, P.L., Moreno, A., and Moro, M. A. (2005). Velázquez. *Farmacología básica y clínica*. Editorial Médica Panamericana.

Lieber, M., Smith, B., Szakal, A., Nelson-Rees, W., and Todaro, G. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int J Cancer* 17, 62-70.

Lippert, J.W., 3rd (2007). Vascular disrupting agents. *Bioorg Med Chem* 15, 605-615.

Liu, Q., and Ruderman, J.V. (2006). Aurora A, mitotic entry, and spindle bipolarity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103, 5811-5816.



Liu, B., Staren, E.D., Iwamura, T., Appert, H.E., and Howard, J.M. (2001). Mechanisms of taxotere-related drug resistance in pancreatic carcinoma. *J Surg Res* 99, 179–86.

Lloyd, C., and Chan, J. (2004). Microtubules and the shape of plants to come. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 13-22.

Lobert, S., Vulevic, B., and Correia, J.J. (1996). Interaction of vinca alkaloids with tubulin: A comparison of vinblastine, vincristine, and vinorelbine. *Biochemistry* 35, 6806-6814.

Lollini, P.L., Cavallo, F., Nanni, P., and Forni, G. (2006). Vaccines for tumour prevention. *Nat Rev Cancer* 6, 204-216.

Longley, R.E., Caddigan, D., Harmody, D., Gunasekera, M., and Gunasekera, S.P. (1991a). Discodermolide--a new, marine-derived immunosuppressive compound. I. In vitro studies. *Transplantation* 52, 650-656.

Longley, R.E., Caddigan, D., Harmody, D., Gunasekera, M., and Gunasekera, S.P. (1991b). Discodermolide--a new, marine-derived immunosuppressive compound. II. In vivo studies. *Transplantation* 52, 656-661.

Louie, K.G., Behrens, B.C., Kinsella, T.J., Hamilton, T.C., Grotzinger, K.R., McKoy, W.M., Winker, M.A., and Ozols, R.F. (1985). Radiation survival parameters of antineoplastic drug-sensitive and -resistant human ovarian cancer cell lines and their modification by buthionine sulfoximine. *Cancer Res* 45, 2110-2115.

Lowe, J., Li, H., Downing, K.H., and Nogales, E. (2001). Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5 Å resolution. *J Mol Biol* 313, 1045-1057.

Lu, Q., and R. Luduena. (1994). In vitro analysis of microtubule assembly of isotypically pure tubulin dimers. Intrinsic differences in the assembly properties of  $\alpha\beta_{II}$ ,  $\alpha\beta_{III}$ , and  $\alpha\beta_{IV}$  tubulin dimers in the absence of microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 269, 2041–2047.

Lu, Q., and Luduena, R.F. (1993). Removal of beta III isotype enhances taxol induced microtubule assembly. *Cell Struct Funct* 18, 173-182.

Luduena, R.F. (1998). Multiple forms of tubulin: different gene products and covalent modifications. *International review of cytology* 178, 207-275.

Lum, B.L., Fisher, G.A., Brophy, N.A., Yahanda, A.M., Adler, K.M., Kaubisch, S., Halsey, J., and Sikic, B.I. (1993). Clinical trials of modulation of multidrug resistance. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Cancer* 72, 3502-3514.

Mabjeesh, N.J., Escuin, D., LaVallee, T.M., Pribluda, V.S., Swartz, G.M., Johnson, M.S., Willard, M.T., Zhong, H., Simons, J.W., and Giannakakou, P. (2003). 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer cell* 3, 363-375.

Madiraju, C., Edler, M.C., Hamel, E., Raccor, B.S., Balachandran, R., Zhu, G., Giuliano, K.A., Vogt, A., Shin, Y., Fournier, J.H., *et al.* (2005). Tubulin assembly, taxoid site binding, and cellular effects of the microtubule-stabilizing agent dictyostatin. *Biochemistry* 44, 15053-15063.

Magnani, M., Maccari, G., Andreu, J.M., Diaz, J.F., and Botta, M. (2009). Possible binding site for paclitaxel at microtubule pores. *FEBS J* 276, 2701-2712.

Makins, R., and Ballinger, A. (2003). Gastrointestinal side effects of drugs. *Expert opinion on drug safety* 2, 421-429.

Marco, J.A., García-Pla, J., Carda, M., Murga, J., Falomir, E., Trigili, C., Notararigo, S., Díaz, J.F., and Barasoain, I. (2011). Design and synthesis of pironetin analogues with simplified structure and study of their interactions with microtubules. *Eur J Med Chem* 46(5),1630-7.

Margolis, R.L., and Wilson, L. (1998). Microtubule treadmilling: what goes around comes around. *Bioessays* 20, 830-836.

Margolis, R.L., and Wilson, L. (1978). Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro. *Cell* 13, 1-8.

Markman, M. (2008). Antineoplastic agents in the management of ovarian cancer: current status and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci* 29, 515-519.

Martello, L.A., McDaid, H.M., Regl, D.L., Yang, C.P., Meng, D., Pettus, T.R., Kaufman, M.D., Arimoto, H., Danishefsky, S.J., Smith, A.B., 3rd, *et al.* (2000). Taxol and discodermolide represent a synergistic drug combination in human carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 6, 1978-1987.

Masters, J.R. (1990). Biochemical basis of resistance to chemotherapy. *Radiother Oncol* 19, 297-305.

Matesanz, R., Barasoain, I., Yang, C., Wang, L., Li, X., De Ines, C., Coderch, C., Gago, F., Jiménez-Barbero, J., Andreu, J.M., et al. (2008). Optimization of taxane binding to microtubules. Binding affinity decomposition and incremental construction of a high-affinity analogue of paclitaxel. *Chem Biol* 15, 573-585.

Mayer, A., Takimoto, M., Fritz, E., Schellander, G., Kofler, K., and Ludwig, H. (1993). The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and *mdr* gene expression in colorectal cancer. *Cancer* 71, 2454-2460.

McDaid, H.M., and Johnston, P.G. (1999). Synergistic interaction between paclitaxel and 8-chloro-adenosine 3',5'-monophosphate in human ovarian carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 5, 215-220.

McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., and West, R.R. (2002). Chromosome-microtubule interactions during mitosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18, 193-219.

McKean, P.G., Vaughan, S., and Gull, K. (2001). The extended tubulin superfamily. *J Cell Sci* 114, 2723-2733.

Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J., and Timasheff, S.N. (1991). Roles of ring C oxygens in the binding of colchicine to tubulin. *Biochemistry* 30, 3770-3777.

Medrano, F.J., Andreu, J.M., Gorbunoff, M.J., and Timasheff, S.N. (1989). Roles of colchicine rings B and C in the binding process to tubulin. *Biochemistry* 28, 5589-5599.

Meresse, P., Dechaux, E., Monneret, C., and Bertounesque, E. (2004). Etoposide: discovery and medicinal chemistry. *Current medicinal chemistry* 11, 2443-2466.

Mesquita, B., Veiga, I., Pereira, D., Tavares, A., Pinto, I.M., Pinto, C., Teixeira, M.R., and Castedo, S. (2005). No significant role for beta tubulin mutations and mismatch repair defects in ovarian cancer resistance to paclitaxel/cisplatin. *BMC cancer* 5, 101.

Miki, H., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005) Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends Cell Biol.* **15**, 467-476.

Mollinedo, F., and Gajate, C. (2003). Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* **8**, 413-450.

Monteagudo, E., Cicero, D.O., Cornett, B., Myles, D.C., and Snyder, J.P. (2001). The conformations of discodermolide in DMSO. *J Am Chem Soc* **123**, 6929-6930.

Montero, A., Fossella, F., Hortobagyi, G., and Valero, V. (2005). Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol* **6**, 229-239.

Montie, J.E., Stewart, B.H., Straffon, R.A., Banowsky, L.H., Hewitt, C.B., and Montague, D.K. (1977). The role of adjunctive nephrectomy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Urol* **117**, 272-275.

Monzo, M., Rosell, R., Sanchez, J.J., Lee, J.S., O'Brate, A., Gonzalez-Larriba, J.L., Alberola, V., Lorenzo, J.C., Nunez, L., Ro, J.Y., *et al.* (1999). Paclitaxel resistance in non-small-cell lung cancer associated with beta-tubulin gene mutations. *J Clin Oncol* **17**, 1786-1793.

Mooberry, S.L., Tien, G., Hernandez, A.H., Plubrukarn, A., and Davidson, B.S. (1999). Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res.* **59**(3), 653-60.

Morris, P.G., and Fornier, M.N. (2008). Microtubule active agents: beyond the taxane frontier. *Clin Cancer Res* **14**, 7167-7172.

Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., and Olson, A.J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem* **19**, 1639-1662.

Mozzetti, S., Ferlini, C., Concolino, P., Filippetti, F., Raspaglio, G., Prislei, S., Gallo, D., Martinelli, E., Ranelletti, F.O., Ferrandina, G., *et al.* (2005). Class III beta-tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **11**, 298-305.

Mucke, N., Wedig, T., Burer, A., Marekov, L.N., Steinert, P.M., Langowski, J., Aebi, U., and Herrmann, H. (2004). Molecular and biophysical characterization of assembly-starter units of human vimentin. *J Mol Biol* 340, 97-114.

Mukherjee, A.K., Basu, S., Sarkar, N., and Ghosh, A.C. (2001). Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem* 8, 1467-1486.

Nair, U.B., Joel, P.B., Wan, Q., Lowey, S., Rould, M.A., and Trybus, K.M. (2008). Crystal structures of monomeric actin bound to cytochalasin D. *J Mol Biol* 384, 848-864.

Nauts, H.C. (1989). Bacteria and cancer--antagonisms and benefits. *Cancer surveys* 8, 713-723.

Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 220-228.

Nerenberg, J.B., Hung, D.T., Somers, P.K., and Schreiber, S.T., (1993). Total synthesis of the immunosuppressive agent (-)-discodermolide. *J. am. Chem. soc* 115, 12621.

Newman, D.J., and Cragg, G.M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod.* 75(3),311-35.

Nguyen, T.L., Xu, X., Gussio, R., Ghosh, A.K., and Hamel, E. (2010). The assembly-inducing laulimalide/peloruside a binding site on tubulin: molecular modeling and biochemical studies with [(3)H]peloruside A. *J Chem Inf Model* 50, 2019-2028.

Nicolaou, K.C., and Sorensen, E.J. (1996). *Classics in Total Synthesis*, VCH.

Nicolaou, K.C., and Snyder, S.A. (2003). *Classics in Total Synthesis II*, VCH.

Nicolaou, K.C., and Snyder, S.A. (2004). The essence of total synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11929-11936.

Nicoletti, M.I., Valoti, G., Giannakakou, P., Zhan, Z., Kim, J.H., Lucchini, V., Landoni, F., Mayo, J.G., Giavazzi, R., and Fojo, T. (2001). Expression of beta-tubulin isotypes in human ovarian carcinoma xenografts and in a sub-panel of

human cancer cell lines from the NCI-Anticancer Drug Screen: correlation with sensitivity to microtubule active agents. *Clin Cancer Res* 7, 2912-2922.

Noble, R.L., Beer, C.T., and Cutts, J.H. (1958). Role of chance observations in chemotherapy: Vinca rosea. *Ann N Y Acad Sci* 76, 882-894.

Nogales E. (2000). Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69, 277-302.

Nogales, E., Wolf, S.G., and Downing, K.H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391, 199-203.

Nogales, E., Wolf, S.G., Khan, I.A., Luduena, R.F., and Downing, K.H. (1995). Structure of tubulin at 6.5 Å and location of the taxol-binding site. *Nature* 375, 424-427.

Nogales, E., Whittaker, M., Milligan, R.A., and Downing, K.H. (1999). High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79-88.

Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maeda, Y., and Narita, A. (2009). The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* 457, 441-445.

Oda, T., Namba, K., and Maeda, Y. (2005). Position and orientation of phalloidin in F-actin determined by X-ray fiber diffraction analysis. *Biophysical Journal* 88, 2727-2736.

Odde, D. (1998). Diffusion inside microtubules. *Eur Biophys J* 27, 514-520.

Okuda, K., Hirose, T., Ishida, H., Kusumoto, S., Sugiyama, T., Ando, K., Shirai, T., Ohnishi, T., Horichi, N., Ohmori, T., *et al.* (2008). Phase I study of the combination of nedaplatin and weekly paclitaxel in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 61, 829-835.

Organización Mundial de la Salud, [www.who.int](http://www.who.int).

Orr, G.A., Verdier-Pinard, P., McDaid, H., Horwitz, S.B. (2003) Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene* 22(47), 7280-95.

Ozben, T. (2006). Mechanisms and strategies to overcome multiple drug resistance in cancer. *FEBS Lett* 580, 2903-2909.

Panda, D., Miller, H.P., and Wilson, L. (2002). Determination of the size and chemical nature of the stabilizing "cap" at microtubule ends using modulators of polymerization dynamics. *Biochemistry* 41 (5), 1609-1617.

Panda, D., Miller, H.P., Banerjee, A., Luduena, R.F., and Wilson, L. (1994). Microtubule dynamics in vitro are regulated by the tubulin isotype composition. *Cell Biol* 91, 11358–11362.

Panda, D., Jordan, M.A., Chu, K.C., and Wilson, L. (1996). Differential effects of vinblastine on polymerization and dynamics at opposite microtubule ends. *J Biol Chem* 271, 29807-29812.

Pape, M., Schnieder, T., and von Samson-Himmelstjerna, G. (2002). Investigation of diversity and isotypes of the beta-tubulin cDNA in several small strongyle (Cyathostominae) species. *The Journal of parasitology* 88, 673-677.

Pasquier, E., Honore, S., and Braguer, D. (2006). Microtubule-targeting agents in angiogenesis: where do we stand? *Drug Resist Updat* 9, 74-86.

Pastan, I., Chaudhary, V., and FitzGerald, D.J. (1992). Recombinant toxins as novel therapeutic agents. *Annu Rev Biochem* 61, 331-354.

Paterson, I., Gardner, N.M., Poullennec, K.G., and Wright, A.E. (2007). Synthesis and biological evaluation of novel analogues of dictyostatin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17, 2443-2447.

Paterson, I., and Lyothier, I. (2004). Total synthesis of (+)-discodermolide: an improved endgame exploiting a Still-Gennari-type olefination with a C1-C8 beta-ketophosphonate fragment. *Org Lett* 6, 4933-4936.

Paterson, I., Menche, D., Hakansson, A.E., Longstaff, A., Wong, D., Barasoain, I., Buey, R.M., and Diaz, J.F. (2005). Design, synthesis and biological evaluation of novel, simplified analogues of laulimalide: modification of the side chain. *Bioorg Med Chem Lett* 15, 2243-2247.

Paulovich, A.G., and Hartwell, L.H. (1995). A checkpoint regulates the rate of progression through S phase in *S. cerevisiae* in response to DNA damage. *Cell* 82, 841-847.

Pelletier, P., and Caventon, J. (1820). *Ann Chim Phys* 14, 69.

Pendleton, A., and Koffer, A. (2001). Effects of latrunculin reveal requirements for the actin cytoskeleton during secretion from mast cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 48, 37-51.

Pera, B., Razzak, M., Trigili, C., Pineda, O., Canales, A., Buey, R.M., Jiménez-Barbero, J., Northcote, P.T., Paterson, I., Barasoain, I., *et al.* (2010). Molecular Recognition of Peloruside A by Microtubules. The C24 Primary Alcohol is Essential for Biological Activity. *Chembiochem* 11, 1669-1678.

Percy, A.J., Slys, G.W., and Schriemer, D.C. (2009). Surrogate H/D detection strategy for protein conformational analysis using MS/MS data. *Anal Chem* 81, 7900-7907.

Perez, R.P., Hamilton, T.C., Ozols, R.F., and Young, R.C. (1993). Mechanisms and modulation of resistance to chemotherapy in ovarian cancer. *Cancer* 71, 1571-1580.

Parry, D.A. (1982). Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins. *Bioscience reports* 2, 1017-1024.

Perry, M.C. (2008). *The chemotherapy source book*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Pettit, G., Cichacz, Z., Gao, F., Boyd, M., and Schmidt, J. (1994). Isolation and structure of the cancer cell growth inhibitor dictyostatin 1. *J Chem Soc Chem Commun*, 1111-1112.

Pineda, O., Farras, J., Maccari, L., Manetti, F., Botta, M., and Vilarrasa, J. (2004). Computational comparison of microtubule-stabilising agents laulimalide and peloruside with taxol and colchicine. *Bioorg Med Chem Lett* 14, 4825-4829.

Ponstingl, H., Krauhs, E., Little, M., and Kempf, T. (1981). Complete amino acid sequence of alpha-tubulin from porcine brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 2757-2761.

Po'uha, S.T., Shum, M.S., Goebel, A., Bernard, O., and Kavallaris, M. (2010). LIM-kinase 2, a regulator of actin dynamics, is involved in mitotic spindle integrity and sensitivity to microtubule-destabilizing drugs. *Oncogene* 29, 597-607.



Prota, A.E., Bargsten, K., Zurwerra, D., Field, J.J., Díaz, J.F., Altmann, K.H., and Steinmetz, M.O. (2013). Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. *Science* 339, 587-590.

Pryor, D.E., O'Brate, A., Bilcer, G., Díaz, J.F., Wang, Y., Kabaki, M., Jung, M.K., Andreu, J.M., Ghosh, A.K., Giannakakou, P., *et al.* (2002). The microtubule stabilizing agent laulimalide does not bind in the taxoid site, kills cells resistant to paclitaxel and epothilones, and may not require its epoxide moiety for activity. *Biochemistry* 41, 9109-9115.

Pusztai, L. (2007). Markers predicting clinical benefit in breast cancer from microtubule-targeting agents. *Ann Oncol* 18 Suppl 12, xii15-20.

Quiñoá, E., Kakou, Y., and Crews, P. (1988). Fijianolides, polyketide heterocyclics from a marine sponge. *J Org Chem* 53, 3642-3644.

Rai, S.S., and Wolff, J. (1996). Localization of the vinblastine-binding site on beta-tubulin. *J Biol Chem* 271, 14707-14711.

Ranganathan, S., Benetatos, C.A., Colarusso, P.J., Dexter, D.W., and Hudes, G.R. (1998). Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* 77, 562-66.

Ravelli, R.B., Gigant, B., Curmi, P.A., Jourdain, I., Lachkar, S., Sobel, A., and Knossow, M. (2004). Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 428, 198-202.

Reymond, S. and Cossy, J. (2008). Migrastatin and analogues: New anti-metastatic agents. *C R Chim* 11, 1447-1462.

Revenu, C., Athman, R., Robine, S., and Louvard, D. (2004). The co-workers of actin filaments: from cell structures to signals. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 635-646.

Rezania, V., Azarenko, O., Jordan, M.A., Bolterauer, H., Ludueña, R.F., Huzil, J.T., and Tuszynski, J.A. (2008). Microtubule Assembly of Isotypically Purified Tubulin and Its Mixtures. *Biophys J* 95(4), 1993-2008.

Rice, R.V., Moses, J.A., McManus, G.M., Brady, A.C., and Blasik, L.M. (1970). The organization of contractile filaments in a mammalian smooth muscle. *J Cell Biol* 47, 183-196.

Richardson, M.A., Ramirez, T., Russell, N.C., and Moye, L.A. (1999). Coley toxins immunotherapy: a retrospective review. *Alternative therapies in health and medicine* 5, 42-47.

Risinger, A.L., Jackson, E.M., Polin, L.A., Helms, G.L., LeBoeuf, D.A., Joe, P.A., Hopper-Borge, E., Ludueña, R.F., Kruh, G.D., and Mooberry, S.L. (2008). The taccalonolides: microtubule stabilizers that circumvent clinically relevant taxane resistance mechanisms. *Cancer Res* 68(21), 8881-8.

Rodionov, V.I., and Borisy, G.G. (1997). Microtubule treadmilling in vivo. *Science* 275, 215-218.

Rodriguez-Esrich, C., Urpi, F., and Vilarrasa, J. (2008). Stereocontrolled total synthesis of amphidinolide X via a silicon-tethered metathesis reaction. *Org Lett* 10, 5191-5194.

Rodriguez-Esrich, C., Olivella, A., Urpi, F., and Vilarrasa, J. (2007). Toward a total synthesis of amphidinolide X and Y. The tetrahydrofuran-containing fragment C12-C21. *Org Lett* 9, 989-992.

Röntgen, W.C. (1895). Ueber eine neue Art von Strahlen. Vorläufige Mitteilung. *Sber. Phys.-Med. Ges. Würzburg* 1895, 132-141.

Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia Coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature* 205, 698-699.

Rosenberg, S.A., Longo, D.L. and Lotze, M.T. (2001). *Cancer principles and practice of oncology*. Philadelphia.

Rosenberg, S.A. (1988). The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. A review. *Ann Surg* 208, 121-135.

Rusan, N.M., Fagerstrom, C.J., Yvon, A.M., and Wadsworth, P. (2001). Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell* 12, 971-980.

Saito, S.Y., Feng, J., Kira, A., Kobayashi, J., and Ohizumi, Y. (2004). Amphidinolide H, a novel type of actin-stabilizing agent isolated from dinoflagellate. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 961-965.

Sakorafas, G.H., and Safioleas, M. (2009). Breast cancer surgery: an historical narrative. Part I. From prehistoric times to Renaissance. *European journal of cancer care* 18, 530-544.

Sato, B., Muramatsu, H., Miyauchi, M., Hori, Y., Takase, S., Hino, M., Hashimoto, S., and Terano, H. (2000). A new antimitotic substance, FR182877. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 53, 123-130.

Schacter, L. (1996). Etoposide phosphate: what, why, where, and how? *Semin Oncol* 23, 1-7.

Schibler, M.J., and Cabral, F. (1986). Taxol-dependent mutants of Chinese hamster ovary cells with alterations in alpha- and beta-tubulin. *J Cell Biol* 102, 1522-1531.

Schiff, P.B., Fant, J., and Horwitz, S.B. (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 665-667.

Schmitt, F.O. (1968). Fibrous proteins--neuronal organelles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 60, 1092-1101.

Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J* 78, 1606-1619.

Schuck, P., Perugini, M.A., Gonzales, N.R., Howlett, G.J., and Schubert, D. (2002). Size-distribution analysis of proteins by analytical ultracentrifugation: strategies and application to model systems. *Biophys J* 82, 1096-1111.

Schwartz, E.L. (2009). Antivascular actions of microtubule-binding drugs. *Clin Cancer Res* 15, 2594-2601.

Scott, R.B. (1970). Cancer chemotherapy--the first twenty-five years. *British medical journal* 4, 259-265.

Scott, A.M., Wolchok, J.D., and Old, L.J. (2012). Antibody therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 278-287.

Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J.D., and Allison, J.P. (2011). Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nat Rev Cancer* 11, 805-812.

Sharom, F.J. (1997). The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and their modulation of activity. *Biochem Soc Trans* 25, 1088-1096.

Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* 300, 1715-1718.

Singh, P., Rathinasamy, K., Mohan, R., and Panda, D. (2008). Microtubule assembly dynamics: an attractive target for anticancer drugs. *IUBMB life* 60, 368-375.

Singh, A.J., Razzak, M., Teesdale-Spittle, P., Gaitanos, T.N., Wilmes, A., Paterson, I., Goodman, J.M., Miller, J.H., and Northcote, P.T. (2011). Structure-activity studies of the pelorusides: new congeners and semi-synthetic analogues. *Org Biomol Chem* 9, 4456-4466.

Skipper, H.E. (1979). Historic milestones in cancer biology: a few that are important in cancer treatment (revisited). *Semin Oncol* 6, 506-514.

Skoufias, D.A., and Wilson, L. (1992). Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry* 31, 738-746.

Slovak, M.L., Hoeltge, G.A., and Trent, J.M. (1987). Cytogenetic alterations associated with the acquisition of doxorubicin resistance: Possible significance of chromosome 7 alterations. *Cancer Res* 47, 6646-6652.

Smith, A.B., 3rd, LaMarche, M.J., and Falcone-Hindley, M. (2001). Solution structure of (+)-discodermolide. *Org Lett* 3, 695-698.

Smith, G., Neubauer, B., Sundboom, J., Best, K., Goode, Tanzer, L., Merriman, R., Frank, J., and Herrmann, R. (1988). Correlation of the in vivo anticoagulant, antithrombotic and metastatic efficacy of warfarin in the rat. *Thromb Res* 50, 163-174.

Spartan 08; Wavefunction, Inc.: Irvine, CA.

Spector, I., Braet, F., Shochet, N.R., and Bubb, M.R. (1999). New anti-actin drugs in the study of the organization and function of the actin cytoskeleton. *Microscopy research and technique* 47, 18-37.

Stacker, S.A., Achen, M.G., Jussila, L., Baldwin, M.E., and Alitalo, K. (2002). Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat Rev Cancer* 2, 573-583.

Stahelin, H., and von Wartburg, A. (1989). From podophyllotoxin glucoside to etoposide. *Progress in drug research Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques* 33, 169-266.

Stahelin, H.F., and von Wartburg, A. (1991). The chemical and biological route from podophyllotoxin glucoside to etoposide: ninth Cain memorial Award lecture. *Cancer Res* 51, 5-15.

Stanton, R.A., Gernert, K.M., Nettles, J.H., and Aneja, R. (2011). Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev* 31, 443-481.

Stavrovskaya, A.A. (2000). Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry Biokhimiia* 65, 95-106.

Steinert, P.M., Marekov, L.N., Fraser, R.D., and Parry, D.A. (1993a). Keratin intermediate filament structure. Crosslinking studies yield quantitative information on molecular dimensions and mechanism of assembly. *J Mol Biol* 230, 436-452.

Steinert, P.M., Marekov, L.N., and Parry, D.A. (1993b). Diversity of intermediate filament structure. Evidence that the alignment of coiled-coil molecules in vimentin is different from that in keratin intermediate filaments. *J Biol Chem* 268, 24916-24925.

Szeverenyi, I., Cassidy, A.J., Chung, C.W., Lee, B.T., Common, J.E., Ogg, S.C., Chen, H., Sim, S.Y., Goh, W.L., Ng, K.W., *et al.* (2008). The Human Intermediate Filament Database: comprehensive information on a gene family involved in many human diseases. *Human mutation* 29, 351-360.

Tafazoli, S., and O'Brien, P.J. (2005). Peroxidases: a role in the metabolism and side effects of drugs. *Drug Discov Today* 10, 617-625.

Talpir, R., Benayahu, Y., Kashman, Y., Pannell, L., Schleyer, M. (1993). *Tetrahedron Lett.* 35, 4453-4456.

Tanaka, J., Blain, J.C., and Allingham, J.S. (2008). Actin-binding toxin "tail" wags the dog. *Chem Biol* 15, 205-207.

Tasaka, K. (1994). Molecular mechanism of histamine release: the role of intermediate filaments and membrane skeletons. *J Physiol Pharmacol* 45, 479-492.

Taylor, M., and Reide, P. (2001). *Lo esencial en farmacología*. Harcourt.

ter Haar, E., Kowalski, R.J., Hamel, E., Lin, C.M., Longley, R.E., Gunasekera, S.P., Rosenkranz, H.S., and Day, B.W. (1996). Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. *Biochemistry* 35, 243-250.

The Journal of Biological Chemistry, <http://www.jbc.org/> Cover Image Archive 2003, 278 (16).

Thompson, W.C., Wilson, L., and Purich, D.L. (1981). Taxol induces microtubule assembly at low temperature. *Cell motility* 1, 445-454.

Tortoriello, A., Facchini, G., Caponigro, F., Santangelo, M., Benassai, G., Persico, G., Citarella, A., Carola, M., Marzano, N., and Iaffaioli, R.V. (1998). Phase I/II study of paclitaxel and vinorelbine in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 47, 91-97.

Toso, R.J., Jordan, M.A., Farrell, K.W., Matsumoto, B., and Wilson, L. (1993). Kinetic stabilization of microtubule dynamic instability in vitro by vinblastine. *Biochemistry* 32, 1285-1293.

Trigili, C., Pera, B., Barbazanges, M., Cossy, J., Meyer, C., Pineda, O., Rodriguez-Esrich, C., Urpi, F., Vilarrasa, J., Diaz, J.F., *et al.* (2011). Mechanism of action of the cytotoxic macrolides amphidinolide X and J. *Chembiochem* 12, 1027-1030.

Tsuda, M., Izui, N., Shimbo, K., Sato, M., Fukushi, E., Kawabata, J., Katsumata, K., Horiguchi, T., and Kobayashi, J. (2003). Amphidinolide X, a novel 16-membered macrodiolide from dinoflagellate *Amphidinium* sp. *J Org Chem* 68, 5339-5345.

Umar, A., Dunn, B.K., and Greenwald, P. (2012). Future directions in cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 12, 835-848.

Uribe, R., and Jay, D. (2009). A review of actin binding proteins: new perspectives. *Mol Biol Rep* 36, 121-125.

Usui, T., Watanabe, H., Nakayama, H., Tada, Y., Kanoh, N., Kondoh, M., Asao, T., Takio, K., Nishikawa, K., Kitahara, T., *et al.* (2004a). The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of alpha-tubulin. *Chem Biol* 11, 799-806.

Usui, T., Kazami, S., Dohmae, N., Mashimo, Y., Kondo, H., Tsuda, M., Terasaki, A.G., Ohashi, K., Kobayashi, J., and Osada, H. (2004b). Amphidinolide h, a potent cytotoxic macrolide, covalently binds on actin subdomain 4 and stabilizes actin filament. *Chem Biol* 11, 1269-1277.

Uckun, F.M., Sudbeck, E.A., Mao, C., Ghosh, S., Liu, X.P., Vassilev, A.O., Navara, C.S., and Narla, R.K. (2001). Structure-based design of novel anticancer agents. *Curr Cancer Drug Targets* 1, 59-71.

Usui, T. (2007). Actin- and microtubule-targeting bioprobes: their binding sites and inhibitory mechanisms. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71, 300-308.

Verrills, N.M., and Kavallaris, M. (2005). Improving the targeting of tubulin-binding agents: lessons from drug resistance studies. *Curr Pharm Des* 11, 1719-1733.

Verrills, N.M., Liem, N.L., Liaw, T.Y., Hood, B.D., Lock, R.B., and Kavallaris, M. (2006a). Proteomic analysis reveals a novel role for the actin cytoskeleton in vincristine resistant childhood leukemia--an in vivo study. *Proteomics* 6, 1681-1694.

Verrills, N.M., Po'uha, S.T., Liu, M.L., Liaw, T.Y., Larsen, M.R., Ivery, M.T., Marshall, G.M., Gunning, P.W., and Kavallaris, M. (2006b). Alterations in gamma-actin and tubulin-targeted drug resistance in childhood leukemia. *J Natl Cancer Inst* 98, 1363-1374.

Villasante, A., Wang, D., Dobner, P., Dolph, P., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1986). Six mouse alpha-tubulin mRNAs encode five distinct isoforms: testis-specific expression of two sister genes. *Mol Cell Biol* 6, 2409-2419.

Vosika, G.J. (1983). Clinical immunotherapy trials of bacterial components derived from Mycobacteria and Nocardia. *Journal of biological response modifiers* 2, 321-342.

Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2), 91–102.

Walker, R.A., O'Brien, E.T., Pryer, N.K., Soboeiro, M.F., Voter, W.A., Erickson, H.P., and Salmon, E.D. (1988). Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *J Cell Biol* 107, 1437-1448.

Wang, Z.Q., Kuo, Y.H., Schnur, D., Bowen, J.P., Liu, S.Y., Han, F.S., Chang, J.Y., Cheng, Y.C., and Lee, K.H. (1990). Antitumor agents. 113. New 4 beta-arylamino derivatives of 4'-O-demethylepipodophyllotoxin and related compounds as potent inhibitors of human DNA topoisomerase II. *J Med Chem* 33, 2660-2666.

Wang, D., Villasante, A., Lewis, S.A., and Cowan, N.J. (1986). The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J Cell Biol* 103, 1903-1910.

Wang, Y., O'Brate, A., Zhou, W., and Giannakakou, P. (2005) Resistance to microtubule-stabilizing drugs involves two events: beta-tubulin mutation in one allele followed by loss of the second allele. *Cell Cycle*. 4 (12), 1847-1853.

Watanabe, H., Watanabe, H., Usui, T., Kondoh, M., Osada, H., and Kitahara, T. (2000). Synthesis of pironetin and related analogs: studies on structure-activity relationships as tubulin assembly inhibitors. *J Antibiot (Tokyo)* 53, 540-545.

Waterman-Storer, C.M., and Salmon, E.D. (1997). Actomyosin-based retrograde flow of microtubules in the lamella of migrating epithelial cells influences microtubule dynamic instability and turnover and is associated with microtubule breakage and treadmilling. *J Cell Biol* 139, 417-434.

Weisenberg, R.C., Borisy, G.G., and Taylor, E.W. (1968). The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* 7, 4466-4479.

West, L.M., Northcote, P.T., and Battershill, C.N. (2000). Peloruside A: A potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem* 65, 445-449.

Wiemann, B., and Starnes, C.O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 64, 529-564.



William, W.N., Jr., Khuri, F.R., Fossella, F.V., Glisson, B.S., Zinner, R.G., Lee, J.J., Herbst, R.S., Lippman, S.M., and Kim, E.S. (2010). Phase II study of vinorelbine and docetaxel in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer as frontline and second-line therapy. *Am J Clin Oncol* 33, 148-152.

Wilmes, A., Bargh, K., Kelly, C., Northcote, P.T., and Miller, J.H. (2007). Peloruside A synergizes with other microtubule stabilizing agents in cultured cancer cell lines. *Mol Pharm* 4, 269-280.

Wilmes, A., O'Sullivan, D., Chan, A., Chandrasekhar, C., Paterson, I., Northcote, P.T., La Flamme, A.C., and Miller J.H. (2010). Synergistic interactions between peloruside A and other microtubule-stabilizing and destabilizing agents in cultured human ovarian carcinoma cells and murine T cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 68(1), 117-26.

Wilson, L., Panda, D., and Jordan, M.A. (1999). Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct Funct* 24, 329-335.

Xiao, Z., Bastow, K.F., Vance, J.R., and Lee, K.H. (2004). Antitumor agents. Part 227: studies on novel 4'-O-demethyl-epipodophyllotoxins as antitumor agents targeting topoisomerase II. *Bioorg Med Chem* 12, 3339-3344.

Xiao, Z., Xiao, Y.D., Feng, J., Golbraikh, A., Tropsha, A., and Lee, K.H. (2002). Antitumor agents. 213. Modeling of epipodophyllotoxin derivatives using variable selection k nearest neighbor QSAR method. *J Med Chem* 45, 2294-2309.

Yasui, K., Tamura, Y., Nakatani, T., Kawada, K., and Ohtani, M. (1995). Total Synthesis of (-)-PA-48153C, a Novel Immunosuppressive 2-Pyrone Derivative. *J. Org. Chem.* 60, 7567-7574.

Yeung, K.S., and Paterson, I. (2002). Actin-binding marine macrolides: total synthesis and biological importance. *Angew Chem Int Ed Engl* 41, 4632-4653.

Yoshida, M., Matsui, Y., Ikarashi, Y., Usui, T., Osada, H., and Wakasugi, H. (2007). Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Res* 27, 729-736.

You, Y. (2005). Podophyllotoxin derivatives: current synthetic approaches for new anticancer agents. *Curr Pharm Des* 11, 1695-1717.

Yue, Q.X., Liu, X., and Guo, D.A. (2010). Microtubule-binding natural products for cancer therapy. *Planta Med* 76, 1037-1043.

Yvon, A.M., Wadsworth, P., and Jordan, M.A. (1999). Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell* 10, 947-959.

Yvon, A.M., Wadsworth, P., and Jordan, M.A. (1999). Taxol suppresses dynamics of individual microtubules in living human tumor cells. *Mol Biol Cell* 10, 947-959.

Zanato, C., Pignataro, L., Ambrosi, A., Hao, Z., Trigili, C., Díaz, J.F., Barasoain, I., Gennari, C. (2011). Highly Stereoselective Total Synthesis of (+)-9-epi-Dictyostatin and (–)-12,13-Bis-epi-dictyostatin. *Eur J Org Chem* 14, 2643-2661.

Zevin, S., and Benowitz, N.L. (1999). Drug interactions with tobacco smoking. An update. *Clinical pharmacokinetics* 36, 425-438.

Zhai, Y., Kronebusch, P.J., Simon, P.M., and Borisy, G.G. (1996). Microtubule dynamics at the G2/M transition: abrupt breakdown of cytoplasmic microtubules at nuclear envelope breakdown and implications for spindle morphogenesis. *J Cell Biol* 135, 201-214.

Zhou, J., and Giannakakou, P. (2005). Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5, 65-71.



## **Publicaciones**



Como se ha mencionado en los agradecimientos, a largo de los cuatro años que han constituido mi período de formación predoctoral, tuve la suerte de colaborar en distintos proyectos de investigación. Dichas colaboraciones han dado lugar a distintas publicaciones.

La publicación que describirá la interacción de los derivados de dictiostatina y discodermolida, en el cual estuvo enfocado mi trabajo, está actualmente en preparación.

Las referencias de las publicaciones científicas de las que soy autora se transcriben a continuación:

Carda, M., Murga, J., Díaz-Oltra, S., García-Pla, J., Paños, J., Falomir, E., **Trigili, C.**, Díaz, J.F., Barasoain I., and Marco, J.A.. Synthesis and biological evaluation of  $\alpha$ -tubulin-binding pironetin analogues with enhanced lipophilicity. Eur. J. Org. Chem. 2013, 1116-1123.

Carda, M., Murga, J., Paños, J., Angulo-Pachón, C.A., García-Pla, J., Díaz-Oltra, S., Marco, J.A., **Trigili, C.**, Redondo-Horcajo, M., Díaz, J.F, and Barasoain I. (2013). Synthesis and Biological Evaluation as Microtubule-Active Agents of Several Tetrahydrofuran and Spiroacetal Derivatives. Curr Med Chem 20, 1173-1182.

Milelli, A., Minarini, A., Zuccari, G., Raffaghello, L., Díaz, J.F., Pera, B., **Trigili, C.**, Barasoain, I., Sissi, C., Alcaro, S., Moraca, F., Micco, M., Zini, M., Stefanelli, C., and Tumiatti, V. (2012). Design, synthesis, and biological evaluation of substituted naphthalene diimides as anticancer agents. Role of the substituents on the two aromatic rings. Eur J Med Chem 57, 417-428.

Field, J.J., Pera, B., Calvo, E., Canales, A., Zurwerra, D., **Trigili, C.**, Rodriguez-Salarichs, J., Matesanz, R., Kanakkanthara, A., Wakefield, S.J., *et al.* (2012). Zampanolide, a Potent New Microtubule-Stabilizing Agent, Covalently Reacts

with the Taxane Luminal Site in Tubulin alpha,beta-Heterodimers and Microtubules. *Chem Biol* 19, 686-698.

Abad, A., Lopez-Perez, J.L., del Olmo, E., Garcia-Fernandez, L.F., Francesch, A., **Trigili, C.**, Barasoain, I., Andreu, J.M., Diaz, J.F., and San Feliciano, A. (2012). Synthesis and antimitotic and tubulin interaction profiles of novel pinacol derivatives of podophyllotoxins. *J Med Chem* 55, 6724-6737.

Xiao, X., Wu, J., **Trigili, C.**, Chen, H., Chu, J.W., Zhao, Y., Lu, P., Sheng, L., Li, Y., Sharom, F.J., *et al.* (2011). Effects of C7 substitutions in a high affinity microtubule-binding taxane on antitumor activity and drug transport. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 4852-4856.

Canales, A., Rodriguez-Salarichs, J., **Trigili, C.**, Nieto, L., Coderch, C., Andreu, J.M., Paterson, I., Jiménez-Barbero, J., and Diaz, J.F. (2011a). Insights into the interaction of discodermolide and docetaxel with tubulin. Mapping the binding sites of microtubule-stabilizing agents by using an integrated NMR and computational approach. *ACS Chem Biol* 6, 789-799.

**Trigili, C.**, Pera, B., Barbazanges, M., Cossy, J., Meyer, C., Pineda, O., Rodriguez-Esrich, C., Urpi, F., Vilarrasa, J., Diaz, J.F., *et al.* (2011). Mechanism of action of the cytotoxic macrolides amphidinolide X and J. *Chembiochem* 12, 1027-1030.

Marco, J.A., Garcia-Pla, J., Carda, M., Murga, J., Falomir, E., **Trigili, C.**, Notararigo, S., Diaz, J.F., and Barasoain, I. (2011). Design and synthesis of pironetin analogues with simplified structure and study of their interactions with microtubules. *Eur J Med Chem* 46, 1630-1637.

Zanato, C., Pignataro, L., Ambrosi, A., Hao, Z., **Trigili, C.**, Díaz, J.F., Barasoain, I., Gennari, C. (2011). Highly Stereoselective Total Synthesis of (+)-9-epi-Dictyostatin and (–)-12,13-Bis-epi-dictyostatin. *Eur J Org Chem* 14, 2643-2661.

Pera, B., Razzak, M., **Trigili, C.**, Pineda, O., Canales, A., Buey, R.M., Jimenez-Barbero, J., Northcote, P.T., Paterson, I., Barasoain, I., *et al.* (2010). Molecular Recognition of Peloruside A by Microtubules. The C24 Primary Alcohol is Essential for Biological Activity. *Chembiochem* 11, 1669-1678.

Barasoain, I., Garcia-Carril, A.M., Matesanz, R., Maccari, G., **Trigili, C.**, Mori, M., Shi, J.Z., Fang, W.S., Andreu, J.M., Botta, M., *et al.* (2010). Probing the pore drug binding site of microtubules with fluorescent taxanes: Evidence of two binding poses. *Chem Biol* 17, 243-253.